(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2001年3月8日 (08.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/16309 A1

---

(51) 国際特許分類⁷: **C12N 15/09**, C07K 14/705, 16/28, C12N 1/21, 5/10, C12P 21/02, 21/08, C12Q 1/68, A61K 45/00, A61P 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05685

(22) 国際出願日: 2000年8月24日 (24.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/241531 1999年8月27日 (27.08.1999) JP
特願2000/217474 2000年7月18日 (18.07.2000) JP

(71) 出願人 *(米国を除く全ての指定国について)*: 武田薬品工業株式会社 **(TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)** [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 *(米国についてのみ)*: 渡辺卓也 **(WATANABE, Takuya)** [JP/JP]; 〒532-0033 大阪府大阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号 Osaka (JP). 寺尾寧子 **(TERAO, Yasuko)** [JP/JP]; 〒305-0034 茨城県つくば市大字小野崎985番地-307号 Ibaraki (JP). 新谷靖 **(SHINTANI, Yasushi)** [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-703号 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外**(TAKAHASHI, Shuichi et al.)**; 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

(81) 指定国 *(国内)*: AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) 指定国 *(広域)*: ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

BEST AVAILABLE COPY

---

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

```
MIT1              AVITGACERD LQCGKGTCCA VSLWIKSVRV CTPVGTSGED CHPASHKIPF
Human (A type)    AVITGACERD VQCGAGTCCA ISLWLRGLRM CTPLGREGEE CHPGSHKIPF
Human (G type)    AVITGACERD VQCGAGTCCA ISLWLRGLRM CTPLGREGEE CHPGSHKVPF

MIT1              SGQRMHHTCP CAPNLACVQT SPKKFKCLSK
Human (A type)    FRKRKHHTCP CLPNLLCSRF PDGRYRCSMD LKNINF
Human (G type)    FRKRKHHTCP CLPNLLCSRF PDGRYRCSMD LKNINF
```

(57) Abstract: A human-origin protein or its salt: a DNA encoding this protein; a method of determining a ligand to the above protein; a method/kit for screening compounds capable of altering the binding properties of the ligand to the protein; the compounds obtained by the screening or salts thereof; etc. The above-described human-origin protein or the DNA encoding the same can be used in: (1) determining a ligand to this protein; (2) preventives and/or remedies for diseases in association with the dysfunction of the above protein; (3) screening compounds (agonists, antagonists, etc.) capable of altering binding properties of the ligand to the protein; etc.

WO 01/16309 A1

/続葉有/

(57) 要約:

ヒト由来の蛋白質またはその塩、該蛋白質をコードするＤＮＡ、該蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングで得られる化合物またはその塩などに関する。

本発明のヒト由来の蛋白質またはそれをコードするＤＮＡは、（１）本発明の蛋白質に対するリガンドの決定、（２）本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤（３）本発明の蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニングなどに用いることができる。

明細書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

技術分野

本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩およびそれをコードするDNAなどに関する。

背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また７個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは７回膜貫通型レセプター蛋白質と総称される。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にはG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

例えば、脳などの中枢神経系の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで脳の生理的な機能の調節が行なわれている。特に、神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物質も多く、そのレセプター蛋白質をコードするｃＤＮＡの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考え

られる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在するかどうかについても分かっていなかった。

脳における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、脳内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、ｃＤＮＡの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたｃＤＮＡの断片配列がExpressed Sequence Tag（ＥＳＴ）としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのＥＳＴは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

発明の開示

本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質）、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡを含有するＤＮＡ、該ＤＮＡを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該蛋白質またはその塩の製造法、該蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、該蛋白質（Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質）に対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質（Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該蛋白質（Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を変化させる化合物またはその塩、およびリガンドと該蛋白質（Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脳由来の新規な蛋白質（Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質）をコードするｃＤＮＡを単離し、全塩基配列を解

析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第１～第７膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのｃＤＮＡにコードされる蛋白質が７回膜貫通型のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した（図３）。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

（１）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩、

（２）上記（１）記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

（３）上記（１）記載の蛋白質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡ、

（４）配列番号：２または配列番号：３で表される塩基配列を有する上記（３）記載のＤＮＡ、

（５）上記（３）記載のＤＮＡを含有する組換えベクター、

（６）上記（５）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

（７）上記（６）記載の形質転換体を培養し、上記（１）記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする上記（１）記載の蛋白質またはその塩の製造法、

（８）上記（１）記載の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

（９）上記（１）記載の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記（１）記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

（１０）上記（１）記載の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（１１）上記（１）記載の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（１２）上記（１０）記載のスクリーニング方法または上記（１１）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（１３）上記（１０）記載のスクリーニング方法または上記（１１）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、および

（１４）上記（3）記載のＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡなどを提供する。

より具体的には、

（１５）蛋白質が、①配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～９個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：１で表わされるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記（1）記載の蛋白質またはその塩、

（１６）上記（1）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（2）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記（１０）記載のリガンドの決定方法、

（１７）リガンドがアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、ＧＨＲＨ、ＣＲＦ、ＡＣＴＨ、ＧＲＰ、ＰＴＨ、ＶＩＰ（バソアクティブ　インテスティ

ナル　アンド　リレイテッド　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、ＣＧＲＰ（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ－ケモカイン（chemokine）（例えば、ＩＬ－８、ＧＲＯα、ＧＲＯβ、ＧＲＯγ、ＮＡＰ－２、ＥＮＡ－７８、ＰＦ４、ＩＰ１０、ＧＣＰ－２、ＭＣＰ－１、ＨＣ１４、ＭＣＰ－３、Ｉ－３０９、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ－１β、ＲＡＮＴＥＳなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、ＴＲＨ、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、Mamba Intestinal Toxin 1（MIT1と略称することがある；Toxicon、28巻、847-856頁、1990年、FEBS Letters 461, 183-188 (1999)）またはその哺乳動物のホモログである上記（９）記載のリガンドの決定方法、

（１８）（ｉ）上記（１）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、（ii）上記（１）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記（１１）記載のスクリーニング方法、

（１９）（ｉ）標識したリガンドを上記（１）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（１）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記（１）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２０）（ｉ）標識したリガンドを上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該

細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（21）（i）標識したリガンドを上記（1）記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（1）記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（22）（i）標識したリガンドを上記（6）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（6）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（23）（i）上記（1）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記（1）記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）上記（1）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（1）記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（24）上記（1）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記（6）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、上記（1）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（6）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、該蛋白

質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２５）上記（１）記載の蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、ＧＨＲＨ、ＣＲＦ、ＡＣＴＨ、ＧＲＰ、ＰＴＨ、ＶＩＰ（バソアクティブ　インテスティナル　アンド　リレイテッド　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、ＣＧＲＰ（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ－ケモカイン（chemokine）（例えば、ＩＬ－８、ＧＲＯα、ＧＲＯβ、ＧＲＯγ、ＮＡＰ－２、ＥＮＡ－７８、ＰＦ４、ＩＰ１０、ＧＣＰ－２、ＭＣＰ－１、ＨＣ１４、ＭＣＰ－３、Ｉ－３０９、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ－１β、ＲＡＮＴＥＳなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、ＴＲＨ、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、MIT1またはその哺乳動物のホモログである上記（２３）または上記（２４）記載のスクリーニング方法、

（２６）上記（１８）～（２５）記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（２７）上記（１８）～（２５）項記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させるの化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（２８）上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記（１１）記載のスクリーニング用キット、

（２９）上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特

徴とする上記（１１）記載のスクリーニング用キット、

（３０）上記（６）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質を含有することを特徴とする上記（１１）記載のスクリーニング用キット、

（３１）上記（２８）～（３０）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（３２）上記（２８）～（３０）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（３３）上記（8）記載の抗体と、上記（1）記載の蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記（1）記載の蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

（３４）上記（8）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（1）記載の蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（1）記載の蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（1）記載の蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および

（３５）被検液と担体上に不溶化した上記（8）記載の抗体および標識化された上記（8）項記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記（1）記載の蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法などを提供する。

図面の簡単な説明

図１は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＣ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図２

に続く）。

図２は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＣ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図１の続き、図３に続く）。

図３は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＣ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図２の続き）。

図４は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＴ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図５に続く）。

図５は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＴ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図４の続き、図６に続く）。

図６は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＴ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図５の続き）。

図７は本発明のヒト脳由来蛋白質の疎水性プロットを示す。

図８は実施例２で行われたZAQの発現分布の解析結果を示す。

図９はＭＩＴ１、ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(Aタイプ)およびヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(Gタイプ)のアミノ酸配列を示す。図中、「ＭＩＴ１」はＭＩＴ１のアミノ酸配列を、「Ｈｕｍａｎ（Ａ ｔｙｐｅ）」はヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（Aタイプ）のアミノ酸配列を、「Ｈｕｍａｎ（Ｂ ｔｙｐｅ）」はヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（Bタイプ）のアミノ酸配列を、それぞれ示す。

図１０は実施例６（６－３）で行われた、精製ZAQリガンドペプチドのZAQ活性化作用の測定結果を示す。

図１１は実施例５（５－１）で用いたプラスミドpCAN618の制限酵素地図を示す。

発明の実施をするための最良の形態

本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）は、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列（図１～図３または図４～図６中のアミノ酸配列）と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である（以下、本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩を本発明の蛋白質と略記する場合がある）。

本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、MEL，M1，CTLL－2，HT－2，WEHI－3，HL－60，JOSK－1，K562，ML－1，MOLT－3，MOLT－4，MOLT－10，CCRF－CEM，TALL－1，Jurkat，CCRT－HSB－2，KE－37，SKW－3，HUT－78，HUT－102，H9，U937，THP－1，HEL，JK－1，CMK，KO－812，MEG－01など）、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の性質を有する蛋白質などが好ましい。

本発明の配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約０．５～２倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、①配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：１で表わされるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個

程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書における蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がＮ末端（アミノ末端）、右端がＣ末端（カルボキシル末端）である。配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする本発明の蛋白質は、Ｃ末端が通常カルボキシル基（$-COOH$）またはカルボキシレート（$-COO^-$）であるが、Ｃ末端がアミド（$-CONH_2$）またはエステル（$-COOR$）であってもよい。

ここでエステルにおけるＲとしては、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピルもしくはｎ－ブチルなどのC_{1-6}アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC_{3-8}シクロアルキル基、例えば、フェニル、α－ナフチルなどのC_{6-12}アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル－C_{1-2}アルキル基もしくはα－ナフチルメチルなどのα－ナフチル－C_{1-2}アルキル基などのC_{7-14}アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明の蛋白質がＣ末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したＣ末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の蛋白質には、上記した蛋白質において、Ｎ末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_{2-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、Ｎ端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、$-OH$、$-SH$、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_{2-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白

質なども含まれる。

本発明の蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）の蛋白質などがあげられる。

本発明の蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明の蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドとしては、図７で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも２０個以上、好ましくは５０個以上、より好ましくは１００個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約５０％以上、好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、さらに好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、より好ましくは１～５個程度、さら

に好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはＣ末端が通常カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（$-\mathrm{COO}^-$）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、Ｃ末端がアミド（$-\mathrm{CONH_2}$）またはエステル（－ＣＯＯＲ）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、Ｎ末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、Ｎ端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドはＣ末端が通常カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（$-\mathrm{COO}^-$）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、Ｃ末端がアミド（$-\mathrm{CONH_2}$）またはエステル（－ＣＯＯＲ）であってもよい。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明の蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述の蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相ク

ロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、４－ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、４－メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、４－ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、４－（2',4'-ジメトキシフェニル－ヒドロキシメチル）フェノキシ樹脂、４－（2',4'-ジメトキシフェニル－Fmocアミノエチル）フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、α－アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル）カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt，HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは､対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド，Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド，Ｎ－メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン，クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキ

シドなどのスルホキシド類、ピリジン，ジオキサン，テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル，プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル，酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約－２０℃～５０℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常１．５～４倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、４－メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、２－ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、２－アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、４－ニトロベンジルエステル、４－メトキシベンジルエステル、４－クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒド

ロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl_2-Bzl、2－ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Ｐｄ－黒あるいはＰｄ-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約－２０℃～４０℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保

護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化なども公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のα－アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV, 205、(1977

年）

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明の蛋白質をコードするＤＮＡとしては、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalＲＮＡまたはmＲＮＡ画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、ＲＴ-ＰＣＲ法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡを有し、本発明の蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例

えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）２nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約１９～４０mM、好ましくは約１９～２０mMで、温度が約５０～７０℃、好ましくは約６０～６５℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約１９mMで温度が約６５℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡがあげられる。

本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有する、または該塩基配列と相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチド（オリゴヌクレオチド）とは、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡを包含するだけではなく、ＲＮＡをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明の蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定された蛋白質をコードする塩基配列の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）は、Ｇ蛋白質共役型蛋白質遺伝子のＲＮＡとハイブリダイズすることができ、該ＲＮＡの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはＧ蛋白質共役型蛋白質関連ＲＮＡとの相互作用を介してＧ蛋白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。Ｇ蛋白質共役型蛋白質関連ＲＮＡの選択された配列に相補的な（オリゴ）ヌクレオチド、及びＧ蛋白質共役型蛋白質関連ＲＮＡと特異的にハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドは、生体内及び生体外でＧ蛋白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。

用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型蛋白質遺伝子の５’端ヘアピンループ、５’端６－ベースペア・リピート、５’端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ＯＲＦ翻訳開始コドン、３’端非翻訳領域、３’端パリンドローム領域、及び３’端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的な（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチドは、２－デオキシ－Ｄ－リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、Ｄ－リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のＮ－グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはＤＮＡやＲＮＡ中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、２本鎖ＤＮＡ、１本鎖ＤＮＡ、２本鎖ＲＮＡ、１本鎖ＲＮＡ、さらにＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、１個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例

えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーＬーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、αアノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば１個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス核酸は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、

結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の３’端あるいは５’端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の３’端あるいは５’端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、ＲＮａｓｅなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸其れ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりｍＲＮＡ画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、ＲＴ-ＰＣＲ法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、

配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡの部分塩基配列を有するＤＮＡ、または②配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡを有し、本発明の蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡの部分塩基配列を有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明の蛋白質と略記する）を完全にコードするＤＮＡのクローニングの手段としては、本発明の蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列の部分塩基配列を有する合成ＤＮＡプライマーを用いてＰＣＲ法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだＤＮＡを本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするＤＮＡ断片もしくは合成ＤＮＡを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）２nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

ＤＮＡの塩基配列の変換は、ＰＣＲや公知のキット、例えば、Mutan™-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan™-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法やGupped duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された蛋白質をコードするＤＮＡは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することが

できる。該ＤＮＡはその５’末端側に翻訳開始コドンとしてのＡＴＧを有し、また３’末端側には翻訳終止コドンとしてのＴＡＡ、ＴＧＡまたはＴＡＧを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成ＤＮＡアダプターを用いて付加することもできる。

本発明の蛋白質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明の蛋白質をコードするＤＮＡから目的とするＤＮＡ断片を切り出し、（ロ）該ＤＮＡ断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、ｐＢＲ３２２，ｐＢＲ３２５，ｐＵＣ１２，ｐＵＣ１３）、枯草菌由来のプラスミド（例、ｐＵＢ１１０，ｐＴＰ５，ｐＣ１９４）、酵母由来プラスミド（例、ｐＳＨ１９，ｐＳＨ１５）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス，ワクシニアウイルス，バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、ｐＡ１－１１、ｐＸＴ１、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＲｃ／ＲＳＶ、ｐｃＤＮＡＩ／Ｎｅｏ、ｐｃＤＮＡ３．１、ｐＲｃ／ＣＭＶ２、ｐＲｃ／ＲＳＶ（Invitrogen社）などが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、ＳＲαプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＨＩＶ-ＬＴＲプロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＨＳＶ-ＴＫプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、ＣＭＶプロモーター、ＳＲαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｒｅｃＡプロモーター、λP_Lプロモーター、ｌｐｐプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、ＳＰＯ１プロモーター、ＳＰＯ２プロモーター、ｐｅｎＰプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロ

モーター、Ｐ１０プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、選択マーカー、ＳＶ４０複製オリジン（以下、ＳＶ４０ｏｒｉと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、ｄｈｆｒと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（ＭＴＸ）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、Ｇ４１８耐性）等が挙げられる。特に、ＣＨＯ（$dhfr^-$）細胞を用いてｄｈｆｒ遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の蛋白質のＮ端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoＡ・シグナル配列、OmpＡ・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α－アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、ＭＦα・シグナル配列、ＳＵＣ２・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α－インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）Ｋ１２・ＤＨ１〔プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），６０巻，１６０（１９６８）〕，ＪＭ１０３〔ヌクイレック・アシッズ・リサーチ，（Nucleic Acids Research），９巻，３０９（１９８１）〕，ＪＡ２２１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular

Biology)〕，１２０巻，５１７（１９７８）〕，ＨＢ１０１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー，４１巻，４５９（１９６９）〕，Ｃ６００〔ジェネティックス（Genetics），３９巻，４４０（１９５４）〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス（Bacillus subtilis）ＭＩ１１４〔ジーン，２４巻，２５５（１９８３）〕，２０７－２１〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Journal of Biochemistry），９５巻，８７（１９８４）〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス　セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）ＡＨ２２，ＡＨ２２Ｒ$^-$，ＮＡ８７－１１Ａ，ＤＫＤ－５Ｄ，２０Ｂ－１２、シゾサッカロマイセス　ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）ＮＣＹＣ１９１３，ＮＣＹＣ２０３６、ピキア　パストリス（Pichia pastoris）などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがＡｃＮＰＶの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞（Spodoptera frugiperda cell；Ｓｆ細胞）、Trichoplusia niの中腸由来のＭＧ１細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがＢｍＮＰＶの場合は、蚕由来株化細胞（Bombyx mori N；ＢｍＮ細胞）などが用いられる。該Ｓｆ細胞としては、例えば、Ｓｆ９細胞（ATCC CRL1711）、Ｓｆ２１細胞（以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ（In Vivo），13, 213-217, (1977)）などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー（Nature），３１５巻，５９２（１９８５）〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞ＣＯＳ－７，Vero，チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ細胞と略記），ｄｈｆｒ遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ（ｄｈｆｒ$^-$）細胞と略記），マウスＬ細胞，マウスＡｔＴ－２０，マウスミエローマ細胞，ラットＧＨ３，ヒトＦＬ細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・

ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），６９巻，２１１０（１９７２）やジーン（Gene），１７巻，１０７（１９８２）などに記載の方法に従って行なうことができる。 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス（Molecular & General Genetics），１６８巻，１１１（１９７９）などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メッソズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology），１９４巻，１８２－１８７（１９９１）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），７５巻，１９２９（１９７８）などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー（Bio/Technology），6, 47-55(1988)）などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊８　新　細胞工学実験プロトコール．２６３－２６７（１９９５）（秀潤社発行）、ヴィロロジー（Virology），５２巻，４５６（１９７３）に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、Ｇ蛋白質共役型蛋白質をコードするＤＮＡを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生

長促進因子などを添加してもよい。培地のｐＨは約５～８が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むＭ９培地〔ミラー（Miller），ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス（Journal of Experiments in Molecular Genetics），４３１－４３３，Cold Spring Harbor Laboratory, New York １９７２〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、３β－インドリル　アクリル酸のような薬剤を加えることができる。　宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約１５～４３℃で約３～２４時間行ない、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約３０～４０℃で約６～２４時間行ない、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー（Burkholder）最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），７７巻，４５０５（１９８０）〕や０．５％カザミノ酸を含有するＳＤ培地〔Bitter, G. A. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），８１巻，５３３０（１９８４）〕が挙げられる。培地のｐＨは約５～８に調整するのが好ましい。培養は通常約２０℃～３５℃で約２４～７２時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium（Grace, T. C. C., ネイチャー（Nature），195, 788(1962)）に非動化した１０％ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のｐＨは約６．２～６．４に調整するのが好ましい。培養は通常約２７℃で約３～５日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約５～２０％の胎児牛血清を含むＭＥＭ培地〔サイエンス（Science），１２２巻，

５０１(１９５２)〕，DMEM培地〔ヴィロロジー（Virology），８巻，３９６(１９５９)〕，RPMI　１６４０培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション（The Journal of the American Medical Association）１９９巻，５１９(１９６７)〕，１９９培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン（Proceeding of the Society for the Biological Medicine），７３巻，１(１９５０)〕などが用いられる。ｐＨは約６～８であるのが好ましい。培養は通常約３０℃～４０℃で約１５～６０時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のＧ蛋白質共役型蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明の蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンＸ－１００^{TM}などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用

する方法などが用いられる。

かくして得られる蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明の蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質等と略記する）に対する抗体は、本発明の蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（ａ）モノクロナール抗体産生細胞の作製

本発明の蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常２〜６週毎に１回ずつ、計２〜１０回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の２～５日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化した本発明の蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature)、２５６巻、４９５頁（１９７５年）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはＰＥＧが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、ＮＳ－１、Ｐ３Ｕ１、ＳＰ２／０などが挙げられるが、Ｐ３Ｕ１が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は１：１～２０：１程度であり、ＰＥＧ（好ましくは、ＰＥＧ１０００～ＰＥＧ６０００）が１０～８０％程度の濃度で添加され、約２０～４０℃、好ましくは約３０～３７℃で約１～１０分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明の蛋白質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインＡを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインＡを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明の蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チ

ミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、１～２０％、好ましくは１０～２０％の牛胎児血清を含むＲＰＭＩ　１６４０培地、１～１０％の牛胎児血清を含むＧＩＴ培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（ＳＦＭ－１０１、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常２０～４０℃、好ましくは約３７℃である。培養時間は、通常５日～３週間、好ましくは１週間～２週間である。培養は、通常５％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（ｂ）モノクロナール抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、ＤＥＡＥ）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインＡあるいはプロテインＧなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明の蛋白質等の抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重

量比でハプテン１に対し、約０．１～２０、好ましくは約１～５の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約２～６週毎に１回ずつ、計約３～１０回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするＤＮＡは、①本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法、②抗体および抗血清の入手、③組換え型蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやＰＣＲプライマーを作成するための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

特に、本発明の組換え型蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なＧ蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニ

ストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明の蛋白質、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質等と略記する場合がある）、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡ（以下、本発明のＤＮＡと略記する場合がある）および本発明の蛋白質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に記載する。

（１）本発明の蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定方法

本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、ＧＨＲＨ、ＣＲＦ、ＡＣＴＨ、ＧＲＰ、ＰＴＨ、ＶＩＰ（バソアクティブ　インテスティナル　アンド　リレイテッド　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、ＣＧＲＰ（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ－ケモカイン（chemokine）（例えば、ＩＬ－８、ＧＲＯα、ＧＲＯβ、ＧＲＯγ、ＮＡＰ－２、ＥＮＡ－７８、ＰＦ４、ＩＰ１０、ＧＣＰ－２、ＭＣＰ－１、ＨＣ１４、ＭＣＰ－３、Ｉ－３０９、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ－１β、ＲＡＮＴＥＳなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、ＴＲＨ、パンクレアティックポリペプタイド、ガ

ラニン、MIT1またはその哺乳動物のホモログなどがあげられ、またその他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明の蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

リガンドがペプチド性リガンドである場合、該リガンドをリガンドペプチドと称することがある。また、リガンドペプチドが前駆体として発現し、シグナルペプチドが除去されて成熟体となる場合、それぞれをリガンド前駆体ペプチドおよびリガンド成熟体ペプチドと称することがあるが、両者を総称して単にリガンドペプチドと称することもある。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩を用いるか、または組換え型蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明の蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓ活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、①標識した試験化合物を、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明の蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いる蛋白質としては、前記した本発明の蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた蛋白質が適している。

本発明の蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該蛋白質をコードするＤＮＡを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするＤＮＡ断片には、通常、相補ＤＮＡが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成ＤＮＡを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするＤＮＡ断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該ＤＮＡ断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus；ＮＰＶ）のポリヘドリンプロモーター、ＳＶ４０由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、ＳＲαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267巻, 19555〜19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩であってもよいし、該蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質を含有する細胞としては、本発明の蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter－Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポ

リトロン（Kinematica社製）による破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速（５００ｒｐｍ～３０００ｒｐｍ）で短時間（通常、約１分～１０分）遠心し、上清をさらに高速（１５０００ｒｐｍ～３００００ｒｐｍ）で通常３０分～２時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該蛋白質を含有する細胞やその膜画分中の蛋白質の量は、１細胞当たり10^3～10^8分子であるのが好ましく、10^5～10^7分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の①～③の方法を実施するためには、適当な蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{35}S〕などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、ＧＨＲＨ、ＣＲＦ、ＡＣＴＨ、ＧＲＰ、ＰＴＨ、ＶＩＰ（バソアクティブ　インテスティナル　アンド　リイテッド　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、ＣＧＲＰ（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、

トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ－ケモカイン（chemokine）（例えば、ＩＬ－８、ＧＲＯα、ＧＲＯβ、ＧＲＯγ、ＮＡＰ－２、ＥＮＡ－７８、ＰＦ４、ＩＰ１０、ＧＣＰ－２、ＭＣＰ－１、ＨＣ１４、ＭＣＰ－３、Ｉ－３０９、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ－１β、ＲＡＮＴＥＳなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、ＴＲＨ、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、MIT1またはその哺乳動物のホモログなどが好適である。

具体的には、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明の蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、ｐＨ４～１０（望ましくはｐＨ６～８）のリン酸バッファー、トリス－塩酸バッファーなどのリガンドと本発明の蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、ＣＨＡＰＳ、Ｔｗｅｅｎ－８０^{TM}（花王－アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でＰＭＳＦ、ロイペプチン、Ｅ－６４（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。０．０１ｍｌ～１０mlの該レセプター溶液に、一定量（５０００ｃｐｍ～５０００００ｃｐｍ）の〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{35}S〕などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（ＮＳＢ）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約０℃から５０℃、望ましくは約４℃から３７℃で、約２０分から２４時間、望ましくは約３０分から３時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ－カウンターで計測する。全結合量（Ｂ）から非特異的結合量（ＮＳＢ）を引いたカウント（Ｂ－ＮＳＢ）が０ｃｐｍを越える試験化合物を本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）

として選択することができる。

本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、該蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、ｃＡＭＰ産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明の蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明の蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明の蛋白質を含有する細胞、または本発明の蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

１．リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、０．０５％のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径０．４５μｍのフィルターで濾過滅菌し、４℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明の蛋白質を発現させたＣＨＯ細胞を、１２穴プレートに5×10^5個／穴で継代し、３７℃、５％CO_2、９５％ａｉｒで２日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の〔^3H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{35}S〕などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを４℃あるいは－２０℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて１μＭに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、ＤＭＳＯ、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを１００～１０００倍濃い濃度に調製する。

２．測定法

①１２穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現ＣＨＯ細胞を、測定用緩衝液１ｍｌで２回洗浄した後、４９０μｌの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を５μｌ加え、室温にて１時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を５μｌ加えておく。

③反応液を除去し、１ｍｌの洗浄用緩衝液で３回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を０．２Ｎ　ＮａＯＨ－１％ＳＤＳで溶解し、４ｍｌの液体シンチレーターＡ（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明の蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、ＧＨＲＨ、ＣＲＦ、Ａ

ＣＴＨ、ＧＲＰ、ＰＴＨ、ＶＩＰ（バソアクティブ　インテスティナル　アンド　リレイテッド　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、ＣＧＲＰ（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ－ケモカイン（chemokine）（例えば、ＩＬ－８、ＧＲＯα、ＧＲＯβ、ＧＲＯγ、ＮＡＰ－２、ＥＮＡ－７８、ＰＦ４、ＩＰ１０、ＧＣＰ－２、ＭＣＰ－１、ＨＣ１４、ＭＣＰ－３、Ｉ－３０９、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ－１β、ＲＡＮＴＥＳなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、ＴＲＨ、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、MIT1またはその哺乳動物のホモログなどが用いられる。

（２）本発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記（１）の方法において、本発明の蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするＤＮＡを、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明の蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない（該蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明の蛋白質を該患者に投与し該蛋白質の量を補充したり、②（イ）本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明の蛋白質をコードするＤＮＡは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として有用である。

本発明の蛋白質または該蛋白質をコードするＤＮＡは中枢疾患（例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害（拒食症）・てんかんなど）、ホルモン系の疾患（例

えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など）、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病·摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症·心肥大·狭心症・動脈硬化等)、呼吸器系疾患（例えば、肺炎、喘息、気管支炎、呼吸器感染症、慢性閉塞性肺疾患等）、感染症（例えば、敗血症、ＭＲＳＡ、呼吸器感染症、尿路感染症、胆道感染症、感染性腸炎、中耳炎、前立腺炎等）の予防および／または治療に有用である。

また、本発明の蛋白質または該蛋白質をコードするＤＮＡは消化器疾患(例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)の予防および／または治療に特に有用である。

本発明の蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明の蛋白質をコードするＤＮＡ（以下、本発明のＤＮＡと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のＤＮＡを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のＤＮＡは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするＤＮＡは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするＤＮＡを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート８０$^{\mathrm{TM}}$、ＨＣＯ－５０）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明の蛋白質またはＤＮＡの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（６０ｋｇとし

て）の消化器疾患患者においては、一日につき約０．１ｍｇ～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（６０ｋｇとして）の消化器疾患患者においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（３）遺伝子診断剤

本発明のＤＮＡは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡまたはｍＲＮＡの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のＤＮＡを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやＰＣＲ－ＳＳＣＰ法（ゲノミックス（Genomics），第５巻，８７４～８７９頁（１９８９年）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー(Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America)，第８６巻，２７６６～２７７０頁（１９８９年））などにより実施することができる。

（４）本発明の蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明の蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明の蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の

①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和４９年発行）

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）

（５）本発明の蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の蛋白質等を用いるか、または組換え型蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）Ｇ蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明の蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、前記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（ｉ）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（ｉ）と（ii）の場合における、

例えば、該蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明の蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明の蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明の蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca^{2+}遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活

性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明の蛋白質等が得られる以前は、Ｇ蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後に該候補化合物が実際にヒトのＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の蛋白質等としては、前記した本発明の蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明の蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

本発明の蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のＤＮＡを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするＤＮＡ断片には相補ＤＮＡが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成ＤＮＡを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするＤＮＡ断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該ＤＮＡ断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus；ＮＰＶ）のポリヘドリンプロモーター、ＳＶ４０由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、ＳＲαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267巻, 19555～19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質等であってもよいし、該蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質等を含有する細胞としては、該蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter－Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速（５００ｒｐｍ～３０００ｒｐｍ）で短時間（通常、約１分～１０分）遠心し、上清をさらに高速（１５０００ｒｐｍ～３００００ｒｐｍ）で通常３０分～２時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該蛋白質等を含有する細胞や膜画分中の該蛋白質の量は、１細胞当たり$１０^{３}$～$１０^{８}$分子であるのが好ましく、$１０^{５}$～$１０^{７}$分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、例えば、適当な蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{35}S〕などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明の蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより蛋白質標品を調製する。バッファーには、ｐＨ４～１０（望ましくはｐＨ６～８）のリン酸バッファー、トリス－塩酸バッファーなどのリガンドと蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、ＣＨＡＰＳ、Ｔｗｅｅｎ－８０^{TM}（花王－アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でＰＭＳＦ、ロイペプチン、Ｅ－６４（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。０．０１ｍｌ～１０ｍｌの該レセプター溶液に、一定量（５０００ｃｐｍ～５０００００ｃｐｍ）の標識したリガンドを添加し、同時に10^{-4}M～10^{-10}Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（ＮＳＢ）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約０℃から５０℃、望ましくは約４℃から３７℃で、約２０分から２４時間、望ましくは約３０分から３時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ－カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（B_0）から非特異的結合量（ＮＳＢ）を引いたカウント（B_0－ＮＳＢ）を１００％とした時、特異的結合量（Ｂ－ＮＳＢ）が、例えば、５０％以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キッ

トを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明の蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、ｃＡＭＰ産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明の蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明の蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質等、本発明の蛋白質等を含有する細胞、または本発明の蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

１．スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、０．０５％のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径０．４５μｍのフィルターで濾過滅菌し、４℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②Ｇ蛋白質共役型レセプター標品

本発明の蛋白質を発現させたＣＨＯ細胞を、１２穴プレートに5×10^5個／穴で継代し、３７℃、５％CO_2、９５％ａｉｒで２日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の〔^{3}Ｈ〕、〔^{125}Ｉ〕、〔^{14}Ｃ〕、〔^{35}Ｓ〕などで標識したリガンド水溶液の状態のものを４℃あるいは－２０℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて１μＭに希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを０．１％ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むＰＢＳで１mMとなるように溶解し、－２０℃で保存する。

２．測定法

①１２穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現ＣＨＯ細胞を、測定用緩衝液１ｍｌで２回洗浄した後、４９０μｌの測定用緩衝液を各穴に加える。

②$10^{-3}$～10^{-10}Ｍの試験化合物溶液を５μｌ加えた後、標識リガンドを５μｌ加え、室温にて１時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに10^{-3}Ｍのリガンドを５μｌ加えておく。

③反応液を除去し、１ｍｌの洗浄用緩衝液で３回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを０．２Ｎ ＮａＯＨ－１％ＳＤＳで溶解し、４ｍｌの液体シンチレーターＡ（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding（ＰＭＢ）を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

ＰＭＢ：Percent Maximum Binding

Ｂ　：検体を加えた時の値

ＮＳＢ：Non-specific Binding（非特異的結合量）

B_0　：最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）Ｇ蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca^{2+}遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のＧ蛋白質共役型蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のＧ蛋白質共役型蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明の蛋白質等に対するアゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬［例えば、中枢疾患(例えばアルツハイマー病·痴呆·摂食障害（拒食症）・てんかんなど)、ホルモン系の疾患（例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など）、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病·摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー·喘息·リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症·心肥大·狭心症・動脈硬化等)、呼吸器系疾患（例えば、肺炎、喘息、気管支炎、呼吸器感染症、慢性閉塞性肺疾患等）、感染症（例えば、敗血症、ＭＲＳＡ、呼吸器感染症、尿路感染症、胆道感染症、感染性腸炎、中耳炎、前立腺炎等）の予防および／

または治療剤など]として有用である。

また、本発明の蛋白質等に対するアゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な消化器疾患(例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)の予防および/または治療剤として特に有用である。

本発明の蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬[例えば、ホルモン分泌調節薬、本発明の蛋白質等に対するリガンドの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患（例えば抗肥満薬・摂食過剰など）、炎症性疾患、循環器疾患、呼吸器系疾患）、感染症の予防および/または治療薬など]として有用である。

本発明の蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な消化器疾患(例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)の予防および/または治療剤として特に有用である。

リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬[例えば、ホルモン分泌調節薬、本発明の蛋白質等に対するリガンドの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患（例えば抗肥満薬・摂食過剰など）、炎症性疾患、循環器疾患、呼吸器系疾患、感染症の予防および/または治療薬など]として有用である。

リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させることができるので、安全で低毒性な消化器疾患(例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)の予防および/または治療剤として特に有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従

って実施することができる。例えば、前記した本発明の蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（６０ｋｇとして）の消化器疾患患者においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（６）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明の蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、（ｉ）本発明の抗体と、被検液および標識化蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法、

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法を提供する。

上記（ii）においては、一方の抗体が本発明の蛋白質等のＮ端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明の蛋白質等のＣ端部に反応する抗体であることが

好ましい。

本発明の蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明の蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のＦ（ａｂ'）$_2$ 、Ｆａｂ'、あるいはＦａｂ画分を用いてもよい。本発明の蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{125}I〕、〔^{131}I〕、〔^{3}H〕、〔^{14}C〕などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の蛋白質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明の蛋白質等の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は本発明の蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明の蛋白質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(Ｆ)と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ，Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標

識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江　寛編「ラジオイムノアッセイ〕（講談社、昭和４９年発行）、入江　寛編「続ラジオイムノアッセイ〕（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「メソッズ・イン・エンジモノジー（Methods in ENZYMOLOGY）」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明の蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いて本発明の蛋白質またはその塩を定量することによって、各種疾病の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の蛋白

質等を検出するために使用することができる。また、本発明の蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明の蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

（７）本発明のＧ蛋白質共役型蛋白質をコードするＤＮＡを有する非ヒト動物の作製

本発明のＤＮＡを用いて、本発明の蛋白質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げれるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のＤＮＡを対象動物に転移させるにあたっては、該ＤＮＡを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のＤＮＡを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のＤＮＡを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明の蛋白質等を高産生するＤＮＡ転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するＮＧＦ遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のＤＮＡの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。ＤＮＡ転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明の蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の蛋白質等を有する。

本発明のＤＮＡ転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認

して、該ＤＮＡ保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的ＤＮＡを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該ＤＮＡを有するように繁殖継代することができる。

本発明のＤＮＡが転移された動物は、本発明の蛋白質等が高発現させられているので、本発明の蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のＤＮＡ転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のＤＮＡ転移マウスの組織中のＤＮＡもしくはＲＮＡを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明の蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明の蛋白質等について分析することができる。本発明の蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明の蛋白質等を単離精製することも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければＬ体を示すものとする。

ＤＮＡ　：デオキシリボ核酸
ｃＤＮＡ　：相補的デオキシリボ核酸
Ａ　：アデニン
Ｔ　：チミン
Ｇ　：グアニン

Ｃ　：シトシン
ＲＮＡ　：リボ核酸
ｍＲＮＡ　：メッセンジャーリボ核酸
ｄＡＴＰ　：デオキシアデノシン三リン酸
ｄＴＴＰ　：デオキシチミジン三リン酸
ｄＧＴＰ　：デオキシグアノシン三リン酸
ｄＣＴＰ　：デオキシシチジン三リン酸
ＧｌｙまたはＧ　：グリシン
ＡｌａまたはＡ　：アラニン
ＶａｌまたはＶ　：バリン
ＬｅｕまたはＬ　：ロイシン
ＩｌｅまたはＩ　：イソロイシン
ＳｅｒまたはＳ　：セリン
ＴｈｒまたはＴ　：スレオニン
ＣｙｓまたはＣ　：システイン
ＭｅｔまたはＭ　：メチオニン
ＧｌｕまたはＥ　：グルタミン酸
ＡｓｐまたはＤ　：アスパラギン酸
ＬｙｓまたはＫ　：リジン
ＡｒｇまたはＲ　：アルギニン
ＨｉｓまたはＨ　：ヒスチジン
ＰｈｅまたはＦ　：フェニルアラニン
ＴｙｒまたはＹ　：チロシン
ＴｒｐまたはＷ　：トリプトファン
ＰｒｏまたはＰ　：プロリン
ＡｓｎまたはＮ　：アスパラギン
ＧｌｎまたはＱ　：グルタミン
ｐＧｌｕ　：ピログルタミン酸

Ｘａａ　：未同定アミノ酸残基
Ｔｏｓ　：ｐ－トルエンスルフォニル
Ｂｚｌ　：ベンジル
Cl_2Bzl　：２，６－ジクロロベンジル
Ｂｏｍ　：ベンジルオキシメチル
Ｚ　：ベンジルオキシカルボニル
Ｃｌ－Ｚ　：２－クロロベンジルオキシカルボニル
Ｂｒ－Ｚ　：２－ブロモベンジルオキシカルボニル
Ｂｏｃ　：ｔ－ブトキシカルボニル
ＤＮＰ　：ジニトロフェノール
Ｔｒｔ　：トリチル
Ｂｕｍ　：ｔ－ブトキシメチル
Ｆｍｏｃ　：Ｎ－９－フルオレニルメトキシカルボニル
ＨＯＢｔ　：１－ヒドロキシベンズトリアゾール
ＨＯＯＢｔ　：３，４－ジヒドロ－３－ヒドロキシ－４－オキソ－１，２，３－ベンゾトリアジン
ＨＯＮＢ　：1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
ＤＣＣ　：Ｎ、Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド
ＡＴＰ　：アデノシン三リン酸
ＥＤＴＡ　：エチレンジアミン四酢酸
ＳＤＳ　：ドデシル硫酸ナトリウム

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：１〕

本発明のヒト脳由来蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２〕

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列を示す（ＺＡＱＣ）。

〔配列番号：３〕

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列を示す（ＺＡＱＴ）。

〔配列番号：４〕

後述の実施例１で用いられたプライマー１の塩基配列を示す。

〔配列番号：５〕

後述の実施例１で用いられたプライマー２の塩基配列を示す。

〔配列番号：６〕

後述の実施例２で用いられたプライマー３の塩基配列を示す。

〔配列番号：７〕

後述の実施例２で用いられたプライマー４の塩基配列を示す。

〔配列番号：８〕

後述の実施例２で用いられた ZAQprobe の塩基配列を示す。

〔配列番号：９〕

後述の実施例２で用いられたプライマーZAQC Salの塩基配列を示す。

〔配列番号：１０〕

後述の実施例２で用いられたプライマーZAQC Speの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１〕

後述の実施例３（３－８）で精製されたZAQ活性化ペプチドのＮ末端のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１２〕

後述の実施例４で用いられたプライマー ZF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：１３〕

後述の実施例４で用いられたプライマー ZF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：１４〕

後述の実施例４で用いられたプライマー ZF3の塩基配列を示す。

〔配列番号：１５〕

後述の実施例４で得られたヒト型ZAQリガンドペプチドをコードするDNAの３’端塩基配列を示す。

〔配列番号：１６〕

後述の実施例４で用いられたプライマー ZAQL-CFの塩基配列を示す。

〔配列番号：１７〕

後述の実施例４で用いられたプライマー ZAQL-XR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：１８〕

後述の実施例４で得られたDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：１９〕

後述の実施例４で得られたDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：２０〕

ヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２１〕

ヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２２〕

ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２３〕

ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２４〕

配列番号：２８で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするDNAを含有するDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：２５〕

配列番号：２９で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするDNAを含有するDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：２６〕

配列番号：２０で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：２７〕

配列番号：２１で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：２８〕

配列番号：２２で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：２９〕

配列番号：２３で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：３０〕

後述の実施例５（５－１）で用いられたDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：３１〕

後述の実施例６（６－２）で分析された、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのＮ末端アミノ酸配列を示す。

後述の実施例１で得られた形質転換体エシェリヒア　コリ（Escherichia coli)ＤＨ５α／ｐＣＲ２．１－ＺＡＱＣは、平成１１年８月２３日から、日本国茨城県つくば市東１－１－３　通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ）に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－６８５５として、平成１１年８月４日から、日本国大阪府大阪市淀川区十三本町２－１７－８５　財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６３０１として寄託されている。

後述の実施例１で得られた形質転換体エシェリヒア　コリ（Escherichia coli）ＤＨ５α／ｐＣＲ２．１－ＺＡＱＴは、平成１１年８月２３日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(ＮＩＢＨ)に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－６８５６として、平成１１年８月４日から財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６３０２として寄託されている。

後述の実施例４で得られた形質転換体エシェリヒア　コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITAは、平成１２年７月１３日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ）に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７２１９として、平成１２年５月２６日から財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６４４０として寄託されている。

後述の実施例４で得られた形質転換体エシェリヒア　コリ（Escherichia

coli）TOP10/pHMITGは、平成１２年７月１３日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ）に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７２２０として、平成１２年５月２６日から財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６４４１として寄託されている。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

実施例１　Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質ＺＡＱをコードするｃＤＮＡのクローニングと塩基配列の決定

ヒト脳下垂体ｃＤＮＡ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を鋳型とし、２個のプライマー、プライマー１（5'- GTC GAC ATG GAG ACC ACC ATG GGG TTC ATG G -3'；配列番号：４）及びプライマー２（5'- ACT AGT TTA TTT TAG TCT GAT GCA GTC CAC CTC TTC -3'；配列番号：５）を用いてＰＣＲ反応を行った。該反応における反応液の組成は上記ｃＤＮＡの１０分の１量を鋳型として使用し、Advantage2 Polymerase Mix（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）１／５０量、プライマー１及びプライマー２を各0.2μM、dNTPs 200μM、及び酵素に添付のバッファーを加え、25μlの液量とした。ＰＣＲ反応は、９４℃・２分の後、９４℃・２０秒、７２℃・１００秒のサイクルを３回、９４℃・２０秒、６８℃・１００秒のサイクルを３回、９４℃・２０秒、６４℃・２０秒、６８℃・１００秒のサイクルを３８回繰り返し、最後に６８℃・７分の伸長反応を行った。該ＰＣＲ反応後の反応産物をＴＡクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌ＤＨ５αに導入し、ｃＤＮＡをもつクローンをアンピシリンを含むＬＢ寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする２種類のｃＤＮＡ配列ＺＡＱＣ（配列番号：２）及びＺＡＱＴ（配列番号：３）を得た。このｃＤＮＡより導き出されるアミノ酸配列を有する蛋白質はいずれも同一配列（配列番号：１）

を有したためＺＡＱと命名し、配列番号：２で表されるＤＮＡを含有する形質転換体を大腸菌（Escherichia coli）DH5α/pCR2.1-ZAQCならびに配列番号：３で表されるＤＮＡを含有する形質転換体を大腸菌DH5α/pCR2.1-ZAQTと命名した。

実施例２　Taqman PCRによるZAQの発現分布の解析

Taqman PCRに用いるプライマー及びプローブは、Primer Express ver.1.0（PEバイオシステムスジャパン）を用いて検索し、プライマー３（5'-TCATGTTGCTCCACTGGAAGG-3'（配列番号：６））、プライマー４（5'-CCAATTGTCTTGAGGTCCAGG-3'（配列番号：７））、ZAQprobe（5'-TTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAG-3'（配列番号：８））を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM（6-carboxyfluorescein）を付加した。

スタンダードDNAとして、pAK－ZAQCを鋳型に、プライマーZAQC Sal（5'-GTCGACATGGAGACCACCATGGGGTTCATGG-3'（配列番号：９））およびZAQC Spe（5'-ACTAGTTTATTTTAGTCTGATGCAGTCCACCTCTTC-3'（配列番号：１０））を用いて増幅したPCR断片を、CHROMA SPIN200（CLONTECH Laboratories, Inc.（CA, USA））を用いて精製し、10^0－10^6コピー/μlに調整して使用した。各組織のcDNAソースとして、Human Multiple Tissue cDNA Panel IおよびPanel II（CLONTECH Laboratories, Inc.）を使用した。プライマー、プローブ、鋳型に、Taqman Universal PCR Master Mix（PEバイオシステムスジャパン）を添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（PEバイオシステムズジャパン）でPCR反応および解析をおこなった。

結果を図８および表１に示した。主に精巣、ついで肺、脳等の部位でZAQの発現がみられた。

表1

tissue	ZAQ(copies/μl)
Brain	6.1
Heart	2.9
Kidney	2.8
Liver	2.6
Lung	7.0
Pancreas	2.1
Placenta	3.2
Skeletal Muscle	2.6
Colon	1.8
Ovary	3.4
Leukocyte	0.0
Prostate	0.7
Small Intestine	2.2
Spleen	2.1
Testis	28.0
Thymus	1.1

実施例3　ZAQを活性化するペプチドの単離

（3—1）牛乳抽出液の調製

市販の低温殺菌牛乳を用いて、以下の操作を行い抽出液を調製した。牛乳2 literを高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて、10,000 rpm、15分間、4℃で遠心し、得られた上清をガーゼでろ過し、脂質片を取り除いた。上清に最終濃度1 Mになるように酢酸を加え、4℃にて30分間攪拌し、次いで高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm、15分間遠心し上清をガーゼでろ過し不溶物を除去した。上清に攪拌しながら2倍容のアセトンを加え4℃にて3時間攪拌した。次いで高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm、15分間遠心後、得られた上清をガーゼでろ過し不溶物を除去した。得られた上清をロータリーエバポレーターにかけ、アセトンを除去し、最終的に1350 mlまで濃縮した。得られた濃縮液を、675 mlごとに338 mlのジエチルエーテルと混合し、分液ロート中にて激しく混和し、2相分離後、水相を得た。得られた水相について同じ操作をさらに1回繰り返し、清澄な水相を得た。得られた水相を、ロータリーエバポレーターを用いて800 mlまで濃縮し、最終的な抽出液を得た。

（３—２）牛乳抽出液のC18逆相クロマトグラフィーによる粗分画

オクタデシル基を固定したシリカゲルを充填したカラムSep-Pak C18（Waters社）10 gをメタノールで膨潤後、1 M 酢酸で平衡化した。このカラムに、（３—１）で調製した抽出液（牛乳2 liter分）を添着した。続いて、このカラムに、100 mlの1 M 酢酸を流しゲルを洗浄した。次に、このカラムに200 mlの60% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸を流し、目的とする粗ペプチド成分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機（12EL； VirTis社）にて凍結乾燥した。

（３－３）牛乳抽出液のスルホプロピルイオン交換クロマトグラフィーによる粗分画

ポリプロピレン製のカラムに100 mM塩酸中で膨潤させたSP Sephadex C-25（Amersham Pharmacia Biotech 社）を、容量が2 mlになるよう充填し、蒸留水及び2 M ギ酸アンモニウム(pH 4.0)で洗浄した後、I 液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:25:74）で平衡化した。上記（３－２）で得られた凍結乾燥物をI 液20 mlに溶解し、SP Sephadex C-25 2 mlにロードした。I 液10 mlで洗浄後、II液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:2.5:6.5）、III液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:1:2）、IV液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:0.5:0.5）各10 mlで順次溶出した。得られたI 液からIV液を、それぞれ凍結乾燥機（12EL； VirTis社）にて凍結乾燥した。

（３—４）牛乳抽出液のTSKgel ODS80Ts逆相高速液体クロマトグラフィーによる分画

TSKgel ODS-80Ts逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、4.6 mm x 25 cm）を、40℃にて、流速1 ml/minで A液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量81.7%/B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し、平衡化した。上記（３—３）で得られたI 液からIV液の凍結乾

燥物 を、それぞれ1M 酢酸4mlに溶解しクロマトグラフィー操作に処した。即ち、凍結乾燥物の溶液4mlを該カラムに添着した後、流速1ml/minで、1分間かけてA液容量67%／B液容量33% まで上昇させ、次いで40分間かけてA液容量67%／B液容量33%からA液容量0%／B液容量100% まで、B液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。

溶出液を、1mlずつフラクション番号をつけて分取し、各フラクション2 μlを150 μl の0.2% Bovine Serum Albumin (BSA) /蒸留水と混合し凍結乾燥した。この乾燥物を後述の（3－5）に記した細胞内Caイオン濃度上昇活性測定用のアッセイ用サンプルとした。

（3―5）FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定

ZAQ 安定発現細胞株は以下のようにして調製した。すなわち、実施例１で得た DH5 α／pCR2.1－ZAQC の１クローンを、アンピシリンを含む LB 培地で振とう培養し、プラスミド pCR2.1－ZAQC を得た。これを制限酵素 Sal I および Spe I で処理し、ZAQC をコードするインサート部分を切り出した。同様に制限酵素 Sal I および Spe I で処理した pAKKO－1.11H と、該インサート部分を Ligation Express Kit （ CLONTECH Laboratories, Inc. （ CA, USA ））を用いて連結し、大腸菌 DH10B にエレクトロポーレーション法にて導入した。得られたクローンの有するプラスミドの構造を、制限酵素処理ならびに配列解析で確認し、正しい構築のものを CHO 細胞発現用プラスミド pAK－ZAQC として使用した。

このプラスミドpAK－ZAQCをCHO/dhfr$^-$細胞（American Type Culture Collection）にCellPhect Transfection kit（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いて形質導入することにより取得した。まず、蒸留水120 μlに溶解したプラスミドDNA 4 μgに対してBuffer A（CellPhect Transfection Kitに添付）120 μlを添加し、撹拌し、10分間静置後、Buffer B（CellPhect Transfection Kitに添付）240 μlを添加し、激しく撹拌し該DNAを含有するＤＮＡ－リン酸カルシウム複合体を形成させた。 5 x 10^{5}個のCHO/ dhfr$^-$ 細胞を60 mmシャーレに播き、10%のウシ胎児血清（BIO WHITTAKER 社）を含む Ham's F-12培地（日水

製薬株式会社）中で37℃、5％炭酸ガス中で１日間培養した後、該ＤＮＡ－リン酸カルシウム複合体の懸濁液480 μl をシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、37℃、5％炭酸ガス中にて６時間培養した後、血清を含まない Ham's F-12培地で２回細胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に15％グリセロールを含む緩衝液(140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1.4 mM Na_2HPO_4, pH7.1) 1.2mlを添加し２分間処理した。これを、再度、血清を含まないHam's F-12培地で２回洗浄した後、10%のウシ胎児血清を含む Ham's F-12培地中で37℃、5％炭酸ガス中で一晩培養した。該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、$2 x 10^4$個ずつ6-well plateに植え込み、透析済み10%ウシ胎児血清（JRH BIOSCIENCES社）、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液（大日本製薬株式会社）、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地（日水製薬株式会社）中にて37℃、5％炭酸ガス中にて培養を開始した。 プラスミドの導入された形質転換CHO細胞は該培地中で生育するが、非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始1日目、および2日目に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始８-10日後に生育してきた形質転換CHO細胞のコロニーを約21個選んだ。それぞれ選択された細胞からRNAを市販のRNA単離用キットを用いて回収し、以降公知のRT-PCR法によりZAQを高発現するZAQ発現CHO細胞B-1番クローン(以後ZAQC-B1細胞と略称する)を選別した。

また、対照としてETA（エンドセリンＡレセプター）発現CHO細胞２４番クローン（以後ETA24細胞と略称する。Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 279巻、675-685頁、1996年参照）を用いた。

上記（３―４）で得られたアッセイ用サンプルについて、ZAQC-B1細胞及びETA24細胞における細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定をFLIPR(Molecular Devices社)を用いて行った。 ZAQC-B1細胞、ETA24細胞共に10％透析処理済ウシ胎児血清(以後d FBSとする)を加えたDMEMで継代培養しているものを用いた。ZAQC-B1細胞、ETA24細胞をそれぞれ15×10^4cells/mlとなるように培地(10% d FBS-DMEM)に懸濁し、FLIPR用96穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200 μlずつ植え込み(3.0×10^4cells/200μl/

ウェル)、5% CO_2インキュベーター中にて37℃で一晩培養した後用いた(以後細胞プレートとする)。H/HBSS（ニッスイハンクス２（日水製薬株式会社） 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g 、水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理）20 ml、250 mM Probenecid 200 μl、ウシ胎児血清(FBS) 200 μlを混合した。また、Fluo 3-AM（同仁化学研究所） 2バイアル(50 μg)をジメチルスルフォキサイド 40 μl、20% Pluronic acid（Molecular Probes社） 40 μlに溶解し、これを上記H/HBSS－Probenecid－FBSに加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル100 μlずつ分注し、5% CO_2インキュベーター中にて37℃で1時間インキュベートした(色素ローディング)。上記（３—４）で得られたアッセイ用サンプルについて、各フラクションに、2.5 mM Probenecid、 0.2% BSAを含むH/HBSS 150 μlを加えて希釈し、FLIPR用96穴プレート(V-Bottomプレート、Coster社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5 mM Probenecidを加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて細胞プレートを４回洗浄し、洗浄後100 μlの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをFLIPRにセットしアッセイを行った(FLIPRにより、サンプルプレートから50 μlのサンプルが細胞プレートへと移される)。

その結果、上記（３－３）IV液を上記（３—４）逆相高速液体クロマトグラフィー分離して得られたフラクションNo.53にZAQC-B1細胞に特異的な細胞内Caイオン濃度上昇活性が見られた。

（３－６）TSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製(1)

TSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、 0.46 cm x 10 cm）を、40℃にて、流速1 ml/minでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量81.7%/Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。上記（３－４）で得られたフラクションNo.53

についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、フラクションNo. 53の溶液1 mlを該カラムに添着した後、流速1 ml/minで、1分間かけてＡ液容量75％／Ｂ液容量25% まで上昇させ、次いで75分間かけてＡ液容量67％／Ｂ液容量33%まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。

溶出液を、500 μlずつフラクションNo. をつけて分取した。分取フラクションより各25 μlづつ0.2% BSA 150 μlと混合し凍結乾燥機（12EL； VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物に、2.5 mM Probenecid、0.2% BSAを含むH/HBSS 150 μl を加えて溶解し、この溶液50 μlを用いて上記（３－５）の試験法により、細胞内Caイオン濃度上昇活性を測定することにより、ZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を有する成分、すなわち、ZAQ活性化成分は、主としてフラクションNo. 103-105に溶出されていることが判明した。

（３－７）μRPC C2/C18 ST 4.6/100逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

μRPC C2/C18 ST 4.6/100逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（Amersham Pharmacia Biotech社、0.46 cm x 10 cm）を、40℃にて、流速1 ml/minでＡ液（ヘプタフルオロ酪酸/蒸留水）容量95%/Ｂ液（0.1%ヘプタフルオロ酪酸/100% アセトニトリル）容量5%を流し平衡化した。

上記（３－６）で得られたTSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo. 103-105をそのままμRPC C2/C18 ST 4.6/100逆相カラムに添着した後、流速 1 ml/minで 1分間で Ａ液(0.1% ヘプタフルオロ酪酸/蒸留水)容量95％／Ｂ液(0.1% ヘプタフルオロ酪酸/100% アセトニトリル）容量5%からＡ液容量65％／Ｂ液容量35%まで急速に上昇させ、これを次に、流速1 ml/minで、60分間かけてＡ液容量50%／Ｂ液容量50% まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液は、210 nmの紫外吸収では単一なピークとして検出された。

溶出液を、500 μlずつフラクション番号をつけて分取し、分取フラクション

より各10 μlづつを0.2% BSA 150 μlと混合し凍結乾燥機（12EL; VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物に、2.5 mM Probenecid、0.2% BSAを含むH/HBSS 150 μlを加えて溶解し、この溶液50 μlを用いて上記（３－５）の試験法により、ZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を有する成分、すなわち、ZAQ活性化成分は、フラクションNo. 82-84に溶出されていることが判明した。この活性ピークは、210 nmの紫外吸収ピークに完全に一致し、単一ペプチドにまで精製されたものと判断した。

（３－８）精製されたZAQ活性化ペプチドの構造解析

上記（３－７）で得られたZAQ活性化成分について以下の方法で構造決定を実施した。ZAQ活性化成分精製標品中の溶媒を真空濃縮機（サーバント）を用いて除去し、得られた乾固物を溶媒DMSO（ジメチルサルフォキシド）に溶解した。この溶液の一部をプロテインシークエンサー（パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC）を用いたＮ末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、Ｎ末端のアミノ酸残基から１６番目のアミノ酸残基のうち、１４残基を同定することができた（Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly （配列番号：１１；Xaaは未同定残基））。

実施例４　ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのcDNAのクローニング

実施例３で得られた牛乳から精製されたZAQを活性化するペプチドのＮ末端アミノ酸配列（配列番号:１１）をクエリーとしてデータベースをBlast検索したところ、配列番号：１１で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列と同等な配列を含むヒトEST(X40467)を見出した。本配列は完全長のオープンリーディング・フレームを有していなかったので、以下にRACE法により未確定部分の配列を明らかにし、引き続いて完全長のオープンリーディング・フレームを有すcDNAクローンを取得した。

EST（X40467）の情報よりプライマー ZF1(配列番号：１２)、ZF2(配列番号：

１３）とZF3(配列番号:１４)を作成し、ヒト精巣Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社)を鋳型として以下に記した3' RACE実験を実施した。

ZF1: 5'-GGTGCCACGCGAGTCTCAATCATGCTCC-3' (配列番号：１２)
ZF2: 5'-GGGGCCTGTGAGCGGGATGTCCAGTGTG-3' (配列番号：１３)
ZF3: 5'-CTTCTTCAGGAAACGCAAGCACCACACC-3' (配列番号：１４)

3' RACEのPCR反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μl、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーZF1を 1 μl、10 μMプライマーAP1 (プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を1 μl、鋳型cDNA (CLONTECH社、ヒト精巣Marathon-Ready cDNA)を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃·60秒の初期変性後、94℃·30秒-72℃·4分のサイクル反応を5回、94℃·30秒-70℃·4分のサイクル反応を5回、94℃·30秒-68℃·44分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μl、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーZF2を 1 μl、10 μMプライマーAP2 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を1 μl、鋳型DNA (該PCR反応液50倍希釈液) を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃·60秒の初期変性後、94℃·30秒-72℃·4分のサイクル反応を5回、94℃·30秒-70℃·4分のサイクル反応を5回、94℃·30秒-68℃·44分のサイクル反応を25回行った。

さらに続いて、該PCR反応の反応液を鋳型として2回目のnested PCRを実施した。反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μl、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture

(2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーZF3を 1 μl、10 μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のものを用いた。）を1 μl、鋳型DNA（該PCR反応液50倍希釈液）を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・60秒の初期変性後、94℃・30秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・44分のサイクル反応を25回行った。得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit（Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、3'端配列（配列番号：１５）を得た。

配列番号:１５で表わされる塩基配列及びEST（X40467）の情報によりプライマーZAQL-CF (配列番号：１６)及びZAQL-XR1 (配列番号：１７)を作成した。ヒト精巣Marathon-Ready cDNA（CLONTECH社)を鋳型としてプライマーZAQL-CF とZAQL-XR1を用いてPCRを実施した。

ZAQL-CF: 5'-CCACCATGAGAGGTGCCACG-3' （配列番号：１６）

ZAQL-XR1: 5'-CTCGAGCTCAGGAAAAGGATGGTG-3' （配列番号：１７）

PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase(Stratagene社)を1 μl、添付の10 x PCR bufferを5 μl、2.5 mM dNTP mixtureを4 μl、10 μMプライマーZAQL-CF及びZAQL-XR1を各2.5 μl 、鋳型DNAを5 μl、及び蒸留水を30 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・1分-60℃・1分-72℃・1分のサイクル反応を40回、および72℃・10分の最終伸長反応とした。得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit（Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA断片の塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読した結果、371bpの、それぞれ配列番号：１８および配列番号：１９で表わされる塩基配列を有していることが明らかとなった。配列番号:１８で表わされる塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpHMITAと、配列番号:１９で表わされる塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpHMITGと命名した。

プラスミドpHMITA及びpHMITGにより大腸菌（Escherichia coli）をトランス

フォームさせ、それぞれエシェリヒア　コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITAおよびエシェリヒア　コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITGと命名した。

これらのDNA断片の塩基配列を解析した結果、配列番号：１８で表わされるDNA断片は、配列番号：２２で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(Aタイプ、105アミノ酸残基)をコードするDNA（配列番号：２８）を含んでおり、配列番号：１９で表わされるDNA断片は、配列番号：２３で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(Gタイプ、105アミノ酸残基)をコードするDNA（配列番号：２９）を含んでいることが明らかとなった。

また、配列番号：２８および配列番号：２９で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号：２８で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号：２０で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド(Aタイプ、86アミノ酸残基)をコードする258塩基対からなるDNA（配列番号：２６）を含んでおり、配列番号：２９で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号：２１で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド(Gタイプ、86アミノ酸残基)をコードする258塩基対からなるDNA（配列番号：２７）を含んでいることが明らかとなった。

実施例５　ヒト型ZAQリガンドペプチドの哺乳動物細胞での産生（１）

（５－１）ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド哺乳動物細胞発現ベクターの構築

実施例４において取得したプラスミドpHMITGからEco RI、Xho I制限酵素消化によってヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチドをコードするcDNAを含む382bpのDNA断片（配列番号：３０）を切出した。

すなわち、プラスミドpHMITGをEco RIおよびXho Iで酵素消化し、得られたDNAを1.5 %アガロースゲルを用いて電気泳動し、サイバーグリーン染色される約382 bpのバンドを含むゲル片を剃刀で切り取った。該ゲル片より Gene Clean spin DNA 抽出キット（BIO 101社）を用いてDNA断片を回収した。得られたDNA断片をCMV-IEエンハンサーおよびchicken beta-actin promoterを発現プロモーターとする哺乳動物細胞発現ベクターpCAN618（図１１）に対してEco RI、Xho I

制限酵素切断部位に定法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA断片の塩基配列を前述の方法により解読した結果、配列番号：３０で表わされる塩基配列を有していることが確認された。このヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチドをコードするDNAを有する哺乳動物細胞発現ベクターをpCANZAQLg2と命名した。

（５-２）COS7細胞への発現ベクターの導入

COS7細胞はATCCより購入し、DMEM培地（10% FBSを加えたもの）を用いて継代培養しているものを用いた。DMEM培地を用いてCOS7細胞を1.5×10^6cells/dishとなるよう10cmシャーレにまき、37℃、5% CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド（pCANZAQLg2）2μg（2μlのTEバッファーに溶解）にバッファーEC（Effectene transfection reagent、QIAGEN）298μlを加え、さらにEnhancer 16μlを加え、1秒間混和後室温で3分間放置した。さらにEffectene Transfection Reagent 60μlを加え、10秒間混和後室温で10分間放置した。前日にまいた細胞の上清を除き、DMEM培地 10 mlで1回洗浄し、DMEM培地を9 mlを加えた。プラスミド溶液にDMEM培地1mlを加えて混和後細胞に滴下し、全体を混ぜた後37℃、5% CO_2インキュベーター中で一晩培養した。DMEM培地10 mlで２回洗浄し、DMEM培地 10mlを加え、37℃、5% CO_2インキュベーター中で一晩培養した。2日後、培養上清を回収した。

（５－３）ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現COS7細胞培養上清からのZAQを活性化するペプチドの部分精製

（５—３－１)ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現COS7細胞培養上清抽出液の調製

ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現COS7細胞培養上清を回収し､以下の操作を行い抽出液を調製した。先ず、細胞培養上清（約18.5ml）に終濃度が1 Mになるように酢酸1.1 mlを滴下し、一時間攪拌した。さらにその2倍容量のアセ

トンを加え、4℃にて30分間攪拌し、次いで高速遠心機（CR26H、23型ローター：日立株式会社）を用いて15,000 rpm, 30分間遠心し上清を得た。得られた上清をエバポレーターにかけ、アセトンを除去した後、凍結乾燥機（１２ＥＬ；VirTis社）にて凍結乾燥した。

（５－３－２）ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現COS7細胞培養上清のSephadex G50ゲルろ過クロマトグラフィー及びSepPakカラムクロマトグラフィー

上記（５－３－１）で得られた凍結乾燥粉末を1M酢酸2mlに溶解後、1 M酢酸で平衡化したSephadex G15（直径３cm、35ml、Pharmacia Biotech 社）カラムに吸着させた後、1 M酢酸をカラムに流し、溶出液を5 mlづつフラクションNo.をつけて分取し、凍結乾燥機（１２ＥＬ；VirTis社）で凍結乾燥させた。

SepPak C18-5gカラム（10ml）を、メタノールにて膨潤後、0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水を流し、平衡化した。Sephadex G50ゲルろ過クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo.1-16の凍結乾燥品をまとめて0.1%トリフルオロ酢酸/蒸留水 3mlに溶解し、SepPak C18-5gカラムに添着した後、0.1%トリフルオロ酢酸/蒸留水 24mlで洗浄後、0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル20mlで溶出した。得られた溶出液をサーバントにかけた。

（５－３－３）Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm）を、40℃にて、流速1 ml/minでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。（５－３－２）で得られたSepPak C18-5gカラムフラクションをサーバントにかけた後、Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィーに添着し、流速 1 ml/minで60分間で Ａ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量100％／Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量0%からＡ液容量0％／Ｂ液容量100%まで直線的グラジエントで上昇させ、溶出液を回収した。

溶出液を、1mlずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクション全量を凍結乾燥機（１２ＥＬ；VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物にH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSAを加えたもの150μlを加えて溶解し、この溶液を用いて下記（５－３－４）の試験法により、ZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を測定した。

（５－３—４）FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定

上記（５－３－３）で得られたサンプルについて、実施例３（３－５）で得られたZAQ発現細胞（ZAQC-B1）における細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定をFLIPRを用いて行った。また、対照としてhOT7T175発現細胞(hOT7T175-16；ＷＯ００／２４８９０に記載)を用いた。

ZAQC-B1細胞、hOT7T175-16細胞共に10%透析処理済ウシ胎児血清(以後d FBSとする)を加えたDMEMで継代培養しているものを用いた。ZAQC-B1細胞、hOT7T175-16細胞をそれぞれ15×10^4cells/mlとなるように培地(10%dFBS-DMEM)に懸濁し、FLIPR用96穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200μlずつ播き(3.0×10^4cells/200μl/ウェル)、5% CO_2インキュベーター中で37℃で一晩培養した後、用いた(以後細胞プレートとする)。H/HBSS(HANKS' 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g、水酸化ナトリウムで pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理)21ml、250mM Probenecid 210μl、ウシ胎児血清(FBS) 210μlを混合した。また、Fluo3-AM 2バイアル(50μg)をジメチルスルフォキサイド 42μl、20% Pluronic acid 42μlに溶解し、これを上記H/HBSS－Probenecid－FBS に加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100μlずつ分注し、5% CO_2インキュベーター中で37℃で1時間インキュベートした(色素ローディング)。上記（５－３—３）で得られたアッセイ用サンプルについて、各フラクションにH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSAを加えたもの150μlを加えて溶解し、FLIPR用96穴プレート(V-Bottomプレート、Coster社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5mM

Probenecidを加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて細胞プレートを４回洗浄し、洗浄後100μlの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをFLIPRにセットし、アッセイを行った(FLIPRにより、サンプルプレートから0.05mlのサンプルが細胞プレートへと移される)。フラクションNo.48-68にZAQC-B1細胞特異的な細胞内Caイオン濃度上昇活性が見られた。このことから、目的とするZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を有する成分、すなわち、ZAQ活性化成分は、フラクションNo.48-68に溶出されていることが判明した。

実施例６　ヒト型ZAQリガンドペプチドの哺乳動物細胞での産生（２）

（６－１）培養上清の調製

実施例５に記載した方法でCOS7細胞にヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド（pCANZAQLg2）を導入した。すなわち、DMEM培地を用いてCOS7細胞を3.0×10^6cells/dishとなるよう15cmシャーレにまき、37℃、5% CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド(pCANZAQLg2) 4μg (4μlのTEバッファーに溶解) にバッファーEC (Effectene transfection reagent、QIAGEN) 600μlを加え、さらにEnhancer 32μlを加え、1秒間混和後室温で3分間放置した。さらにEffectene Transfection Reagent 120μlを加え、10秒間混和後室温で10分間放置した。前日にまいた細胞の上清を除き、DMEM培地 10 mlで1回洗浄し、DMEM培地を30 mlを加えた。プラスミド溶液にDMEM培地1mlを加えて混和後細胞に滴下し、全体を混ぜた後37℃、5% CO_2インキュベーター中で一晩培養した。DMEM培地10 mlで1回洗浄し、DMEM培地 20mlを加え、37℃、5% CO_2インキュベーター中で一晩培養した。1日後、培養上清を回収し、さらにDMEM培地 20mlを加え、37℃、5% CO_2インキュベーター中で一晩培養した後培養上清を回収した。

（６－２）培養上清からのヒト型ZAQリガンドペプチドの精製

（６－１）に記載した方法で15 cmシャーレ８０枚分の培養上清を回収し、こ

れに酢酸を終濃度１Mになるように添加した。１時間攪拌した後、２倍容のアセトンを添加し蛋白質を析出させた。4℃にて30分間攪拌し、次いで高速遠心機（CR26H、RR10A 型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm, 30分間遠心し上清を得た。得られた上清をエバポレーターにかけアセトンを除去し、あらかじめ0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水で平衡化した逆相カラム（Waters社C18、100ｇ）に流した。0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水 1000ml、次いで0.1% トリフルオロ酢酸/20% アセトニトリル1000mlでカラムを洗浄した後、0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル1000mlでペプチドを溶出した。得られた溶出液をエバポレーターにかけた後、凍結乾燥器（１２ＥＬ； VirTis社）にて凍結乾燥した。

TSKgel ODS80TM逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、21.5 mm x 30 cm）を、40℃にて、流速4 ml/minでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。得られた凍結乾燥粉末をＡ液に溶解した後、該ODS80TMカラムに添着し、流速 4 ml/minで120分間に Ａ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量60％／Ｂ液(0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル)容量40%からＡ液容量0％／Ｂ液容量100%まで直線的グラジエントで上昇させて、ペプチドを溶出させた。

溶出液を、８ mlずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクションから50 μlを取り凍結乾燥機（１２ＥＬ； VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物にH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2％ BSAを加えたもの200μlを加えて溶解し、この溶液を用いて上記（５－３－４）の試験法により、 ZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を有する成分、すなわち、ZAQ活性化成分は、フラクションNo. 32に溶出されていることが判った。

TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、4.6 mm x 25 cm）を、25 ℃にて、流速1 ml/minでＡ液（10 mMぎ酸アンモニウム/10% アセトニトリル）を流し、平衡化した。上記フラクションNo.32を該CM-2SWカラムに添着し、流速 1 ml/minで60分間に Ａ液（10 mMぎ酸アン

モニウム/10% アセトニトリル）容量100％／Ｂ液（1000 mMぎ酸アンモニウム/10% アセトニトリル）容量0%からＡ液容量0％／Ｂ液容量100%まで直線的グラジエントで上昇させて、ペプチドを溶出させた。

溶出液を、１ mlずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクションから1.5 μlを取り、これをH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2％ BSA 200μl希釈し、この溶液を用いて上記（５－３－４）の試験法により、 ZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を有する成分、すなわち、ZAQ活性化成分は、フラクションNo. 56および57に溶出されていることが判った。

TSKgel Super phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、4.6 mm x 10 cm）を、40 ℃にて、流速1 ml/minでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。上記フラクション No.56および57を該Super phenylカラムに添着し、流速 1 ml/minで60分間に Ａ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量70％／Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量30%からＡ液容量50％／Ｂ液容量50%まで直線的グラジエントで上昇させて、ペプチドを溶出させた。

溶出液を、１ mlずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクションから1.5 μlを取り、これをH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2％ BSA 200μl希釈し、この溶液を用いて上記（５－３－４）の試験法により、 ZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を有する成分、すなわち、ZAQ活性化成分は、フラクションNo. 54、 55および56に溶出されていることが判った。本活性は単一な紫外吸収ピークと一致し、活性成分が単一にまで精製されたものと判断した。

ZAQ活性化成分精製標品中の溶媒を凍結乾燥して除去し、得られた凍結乾燥物を溶媒DMSO(ジメチルサルフォキシド)に溶解した。この溶液の一部(約7.5 pmol)をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC)を用いたＮ末端アミノ酸配列解析に供した。その結果、Ｎ末端のアミノ酸残基から１０番目のアミノ酸残基のうち、９残基を同定することが

できた（Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp （配列番号：３１；Xaaは未同定残基））。得られたアミノ酸配列は、予想されるヒト型ZAQリガンド成熟体ペプチドのＮ端アミノ酸配列と一致した。また、ZAQ活性化成分精製標品の質量分析を Finnigan LCQ LC/MS装置(Thermoquest, San Jose, CA)を用いて、エレクトロスプレーイオン化法により実施し、分子量が9657.6であることを確認した。これは１０個のシステイン残基がすべてジスルフィド結合を形成した86残基のヒト型ZAQリガンド成熟体ペプチド（配列番号：２１）の理論値9657.3に良く一致し、ZAQ活性化成分精製標品が、配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を有するヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドを有していることが確認された。

（６－３）精製ヒト型ZAQリガンドペプチドのZAQ活性化作用の測定

上記（６－２）で精製したヒト型ZAQリガンド成熟体ペプチドのZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を上記（５－３－４）の試験法により測定した。その結果、ZAQ発現CHO細胞（ZAQC-B1細胞）においてヒト型ZAQリガンド成熟体ペプチドは濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起した。EC_{50}値は96 pMで、ヒト型ZAQリガンド成熟体ペプチドは非常に強いアゴニスト活性を示すことが明らかとなった。結果を図１０に示す。

産業上の利用可能性

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするＤＮＡは、①リガンド（アゴニスト）の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやＰＣＲプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

請求の範囲

１．配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩。

２．請求項１記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

３．請求項１記載の蛋白質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡ。

４．配列番号：２または配列番号：３で表される塩基配列を有する請求項３記載のＤＮＡ。

５．請求項３記載のＤＮＡを含有する組換えベクター。

６．請求項５記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

７．請求項６記載の形質転換体を培養し、請求項１記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項１記載の蛋白質またはその塩の製造法。

８．請求項１記載の蛋白質もしくは請求項２記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

９．請求項１記載の蛋白質もしくは請求項２記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項１記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

１０．請求項１記載の蛋白質もしくは請求項２記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項１記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

１１．請求項１記載の蛋白質もしくは請求項２記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項１記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

１２．請求項１０記載のスクリーニング方法または請求項１１記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項１記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

１３．請求項１０記載のスクリーニング方法または請求項１１記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項１記載の蛋白質または

その塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

１４．請求項３記載のＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡ。

図 1

10 20 30 40 50 60
ATGGAGACCACCATGGGGTTCATGGATGACAATGCCACCAACACTTCCACCAGCTTCCTT
M E T T M G F M D D N A T N T S T S F L

70 80 90 100 110 120
TCTGTGCTCAACCCTCATGGAGCCCATGCCACTTCCTTCCCATTCAACTTCAGCTACAGC
S V L N P H G A H A T S F P F N F S Y S

130 140 150 160 170 180
GACTATGATATGCCTTTGGATGAAGATGAGGATGTGACCAATTCCAGGACGTTCTTTGCT
D Y D M P L D E D E D V T N S R T F F A

190 200 210 220 230 240
GCCAAGATTGTCATTGGGATGGCCCTGGTGGGCATCATGCTGGTCTGCGGCATTGGAAAC
A K I V I G M A L V G I M L V C G I G N

250 260 270 280 290 300
TTCATCTTTATCGCTGCCCTGGTCCGCTACAAGAAACTGCGCAACCTCACCAACCTGCTC
F I F I A A L V R Y K K L R N L T N L L

310 320 330 340 350 360
ATCGCCAACCTGGCCATCTCTGACTTCCTGGTGGCCATTGTCTGCTGCCCCTTTGAGATG
I A N L A I S D F L V A I V C C P F E M

370 380 390 400 410 420
GACTACTATGTGGTGCGCCAGCTCTCCTGGGAGCACGGCCACGTCCTGTGCACCTCTGTC
D Y Y V V R Q L S W E H G H V L C T S V

図 2

```
       430       440       450       460       470       480
AACTACCTGCGCACTGTCTCTCTCTATGTCTCCACCAATGCCCTGCTGGCCATCGCCATT
N  Y  L  R  T  V  S  L  Y  V  S  T  N  A  L  L  A  I  A  I

       490       500       510       520       530       540
GACAGGTATCTGGCTATTGTCCATCCGCTGAGACCACGGATGAAGTGCCAAACAGCCACT
D  R  Y  L  A  I  V  H  P  L  R  P  R  M  K  C  Q  T  A  T

       550       560       570       580       590       600
GGCCTGATTGCCTTGGTGTGGACGGTGTCCATCCTGATCGCCATCCCTTCCGCCTACTTC
G  L  I  A  L  V  W  T  V  S  I  L  I  A  I  P  S  A  Y  F

       610       620       630       640       650       660
ACCACCGAGACGGTCCTCGTCATTGTCAAGAGCCAGGAAAAGATCTTCTGCGGCCAGATC
T  T  E  T  V  L  V  I  V  K  S  Q  E  K  I  F  C  G  Q  I

       670       680       690       700       710       720
TGGCCTGTGGACCAGCAGCTCTACTACAAGTCCTACTTCCTCTTTATCTTTGGCATAGAA
W  P  V  D  Q  Q  L  Y  Y  K  S  Y  F  L  F  I  F  G  I  E

       730       740       750       760       770       780
TTCGTGGGCCCCGTGGTCACCATGACCCTGTGCTATGCCAGGATCTCCCGGGAGCTCTGG
F  V  G  P  V  V  T  M  T  L  C  Y  A  R  I  S  R  E  L  W

       790       800       810       820       830       840
TTCAAGGCGGTCCCTGGATTCCAGACAGAGCAGATCCGCAAGAGGCTGCGCTGCCGCAGG
F  K  A  V  P  G  F  Q  T  E  Q  I  R  K  R  L  R  C  R  R

       850       860       870       880       890       900
AAGACGGTCCTGGTGCTCATGTGCATCCTCACCGCCTACGTGCTATGCTGGGCGCCCTTC
K  T  V  L  V  L  M  C  I  L  T  A  Y  V  L  C  W  A  P  F
```

図 3

```
         910       920       930       940       950       960
TACGGCTTCACCATCGTGCGCGACTTCTTCCCCACCGTGTTCGTGAAGGAGAAGCACTAC
 Y  G  F  T  I  V  R  D  F  F  P  T  V  F  V  K  E  K  H  Y

         970       980       990      1000      1010      1020
CTCACTGCCTTCTACATCGTCGAGTGCATCGCCATGAGCAACAGCATGATCAACACTCTG
 L  T  A  F  Y  I  V  E  C  I  A  M  S  N  S  M  I  N  T  L

        1030      1040      1050      1060      1070      1080
TGCTTCGTGACCGTCAAGAACGACACCGTCAAGTACTTCAAAAAGATCATGTTGCTCCAC
 C  F  V  T  V  K  N  D  T  V  K  Y  F  K  K  I  M  L  L  H

        1090      1100      1110      1120      1130      1140
TGGAAGGCTTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAGACCTGGACCTCAAGACAATTGGG
 W  K  A  S  Y  N  G  G  K  S  S  A  D  L  D  L  K  T  I  G

        1150      1160      1170      1180      1190
ATGCCTGCCACCGAAGAGGTGGACTGCATCAGACTAAAATAA
 M  P  A  T  E  E  V  D  C  I  R  L  K  *
```

図 4

```
         10        20        30        40        50        60
ATGGAGACCACCATGGGGTTCATGGATGACAATGCCACCAACACTTCCACCAGCTTCCTT
M  E  T  T  M  G  F  M  D  D  N  A  T  N  T  S  T  S  F  L

         70        80        90       100       110       120
TCTGTGCTCAACCCTCATGGAGCCCATGCCACTTCCTTCCCATTCAACTTCAGCTACAGC
S  V  L  N  P  H  G  A  H  A  T  S  F  P  F  N  F  S  Y  S

        130       140       150       160       170       180
GACTATGATATGCCTTTGGATGAAGATGAGGATGTGACCAATTCCAGGACGTTCTTTGCT
D  Y  D  M  P  L  D  E  D  E  D  V  T  N  S  R  T  F  F  A

        190       200       210       220       230       240
GCCAAGATTGTCATTGGGATGGCCCTGGTGGGCATCATGCTGGTCTGCGGCATTGGAAAC
A  K  I  V  I  G  M  A  L  V  G  I  M  L  V  C  G  I  G  N

        250       260       270       280       290       300
TTCATCTTTATCGCTGCCCTGGTCCGCTACAAGAAACTGCGCAACCTCACCAACCTGCTC
F  I  F  I  A  A  L  V  R  Y  K  K  L  R  N  L  T  N  L  L

        310       320       330       340       350       360
ATCGCCAACCTGGCCATCTCTGACTTCCTGGTGGCCATTGTCTGCTGCCCCTTTGAGATG
I  A  N  L  A  I  S  D  F  L  V  A  I  V  C  C  P  F  E  M

        370       380       390       400       410       420
GACTACTATGTGGTGCGCCAGCTCTCCTGGGAGCACGGCCACGTCCTGTGCACCTCTGTC
D  Y  Y  V  V  R  Q  L  S  W  E  H  G  H  V  L  C  T  S  V
```

図 5

```
         430       440       450       460       470       480
AACTACCTGCGCACTGTCTCTCTCTATGTCTCCACCAATGCCCTGCTGGCCATCGCCATT
N  Y  L  R  T  V  S  L  Y  V  S  T  N  A  L  L  A  I  A  I

         490       500       510       520       530       540
GACAGGTATCTGGCTATTGTCCATCCGCTGAGACCACGGATGAAGTGCCAAACAGCCACT
D  R  Y  L  A  I  V  H  P  L  R  P  R  M  K  C  Q  T  A  T

         550       560       570       580       590       600
GGCCTGATTGCCTTGGTGTGGACGGTGTCCATCCTGATCGCCATCCCTTCCGCCTACTTC
G  L  I  A  L  V  W  T  V  S  I  L  I  A  I  P  S  A  Y  F

         610       620       630       640       650       660
ACCACCGAGACGGTCCTCGTCATTGTCAAGAGCCAGGAAAAGATCTTCTGCGGCCAGATC
T  T  E  T  V  L  V  I  V  K  S  Q  E  K  I  F  C  G  Q  I

         670       680       690       700       710       720
TGGCCTGTGGACCAGCAGCTCTACTACAAGTCCTACTTCCTCTTTATCTTTGGCATAGAA
W  P  V  D  Q  Q  L  Y  Y  K  S  Y  F  L  F  I  F  G  I  E

         730       740       750       760       770       780
TTCGTGGGCCCCGTGGTCACCATGACCCTGTGCTATGCCAGGATCTCCCGGGAGCTCTGG
F  V  G  P  V  V  T  M  T  L  C  Y  A  R  I  S  R  E  L  W

         790       800       810       820       830       840
TTCAAGGCGGTCCCTGGATTCCAGACAGAGCAGATCCGCAAGAGGCTGCGCTGCCGCAGG
F  K  A  V  P  G  F  Q  T  E  Q  I  R  K  R  L  R  C  R  R

         850       860       870       880       890       900
AAGACGGTCCTGGTGCTCATGTGCATCCTCACCGCCTACGTGCTATGCTGGGCGCCCTTC
K  T  V  L  V  L  M  C  I  L  T  A  Y  V  L  C  W  A  P  F
```

図 6

```
        910       920       930       940       950       960
TACGGCTTCACCATCGTGCGCGACTTCTTCCCCACCGTGTTTGTGAAGGAGAAGCACTAC
 Y  G  F  T  I  V  R  D  F  F  P  T  V  F  V  K  E  K  H  Y

        970       980       990      1000      1010      1020
CTCACTGCCTTCTACATCGTCGAGTGCATCGCCATGAGCAACAGCATGATCAACACTCTG
 L  T  A  F  Y  I  V  E  C  I  A  M  S  N  S  M  I  N  T  L

       1030      1040      1050      1060      1070      1080
TGCTTCGTGACCGTCAAGAACGACACCGTCAAGTACTTCAAAAAGATCATGTTGCTCCAC
 C  F  V  T  V  K  N  D  T  V  K  Y  F  K  K  I  M  L  L  H

       1090      1100      1110      1120      1130      1140
TGGAAGGCTTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAGACCTGGACCTCAAGACAATTGGG
 W  K  A  S  Y  N  G  G  K  S  S  A  D  L  D  L  K  T  I  G

       1150      1160      1170      1180      1190
ATGCCTGCCACCGAAGAGGTGGACTGCATCAGACTAAAATAA
 M  P  A  T  E  E  V  D  C  I  R  L  K  *
```

図 7

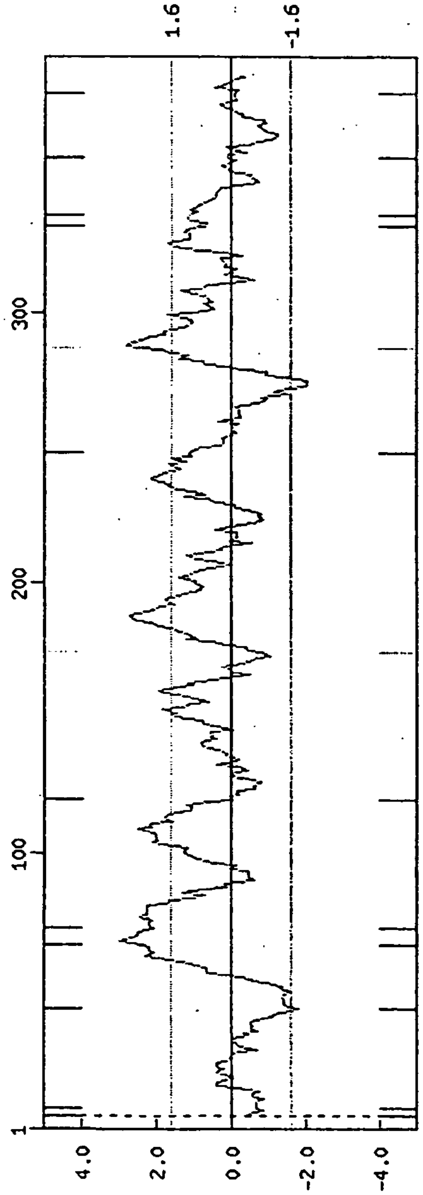


図 8

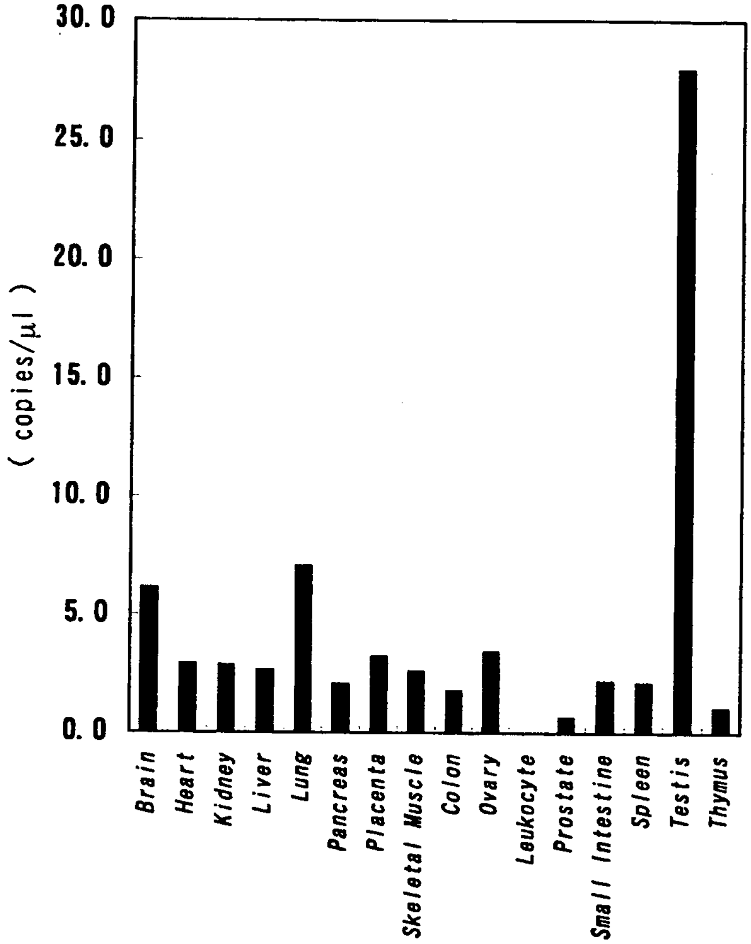

30. 0
25. 0
20. 0
15. 0
10. 0
5. 0
0. 0
(copies/μl)
Brain
Heart
Kidney
Liver
Lung
Pancreas
Placenta
Skeletal Muscle
Colon
Ovary
Leukocyte
Prostate
Small Intestine
Spleen
Testis
Thymus

図 9

```
MIT1               AVITGACERD LQCGKGTCCA VSLWIKSVRV CTPVGTSGED CHPASHKIPF
Human (A type)     AVITGACERD VQCGAGTCCA ISLWLRGLRM CTPLGREGEE CHPGSHKIPF
Human (G type)     AVITGACERD VQCGAGTCCA ISLWLRGLRM CTPLGREGEE CHPGSHKVPF

MIT1               SGQRMHHTCP CAPNLACVQT SPKKFKCLSK
Human (A type)     FRKRKHHTCP CLPNLLCSRF PDGRYRCSMD LKNINF
Human (G type)     FRKRKHHTCP CLPNLLCSRF PDGRYRCSMD LKNINF
```

図 1 0

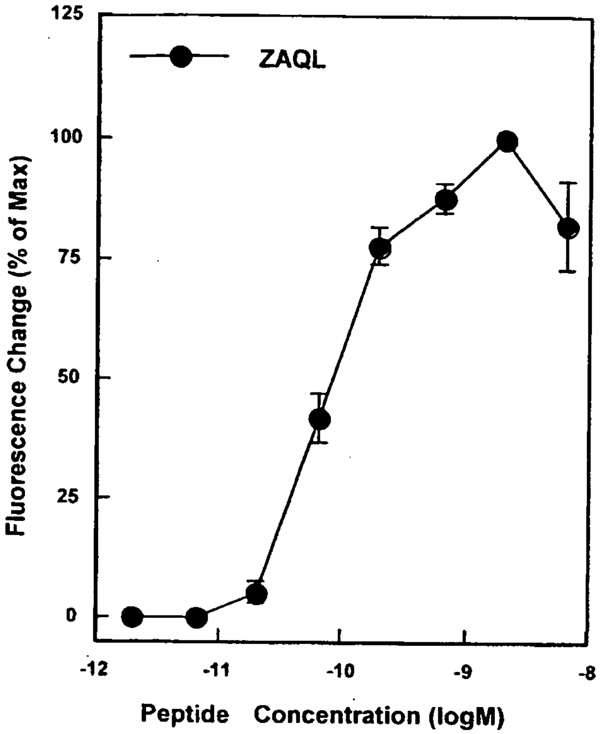
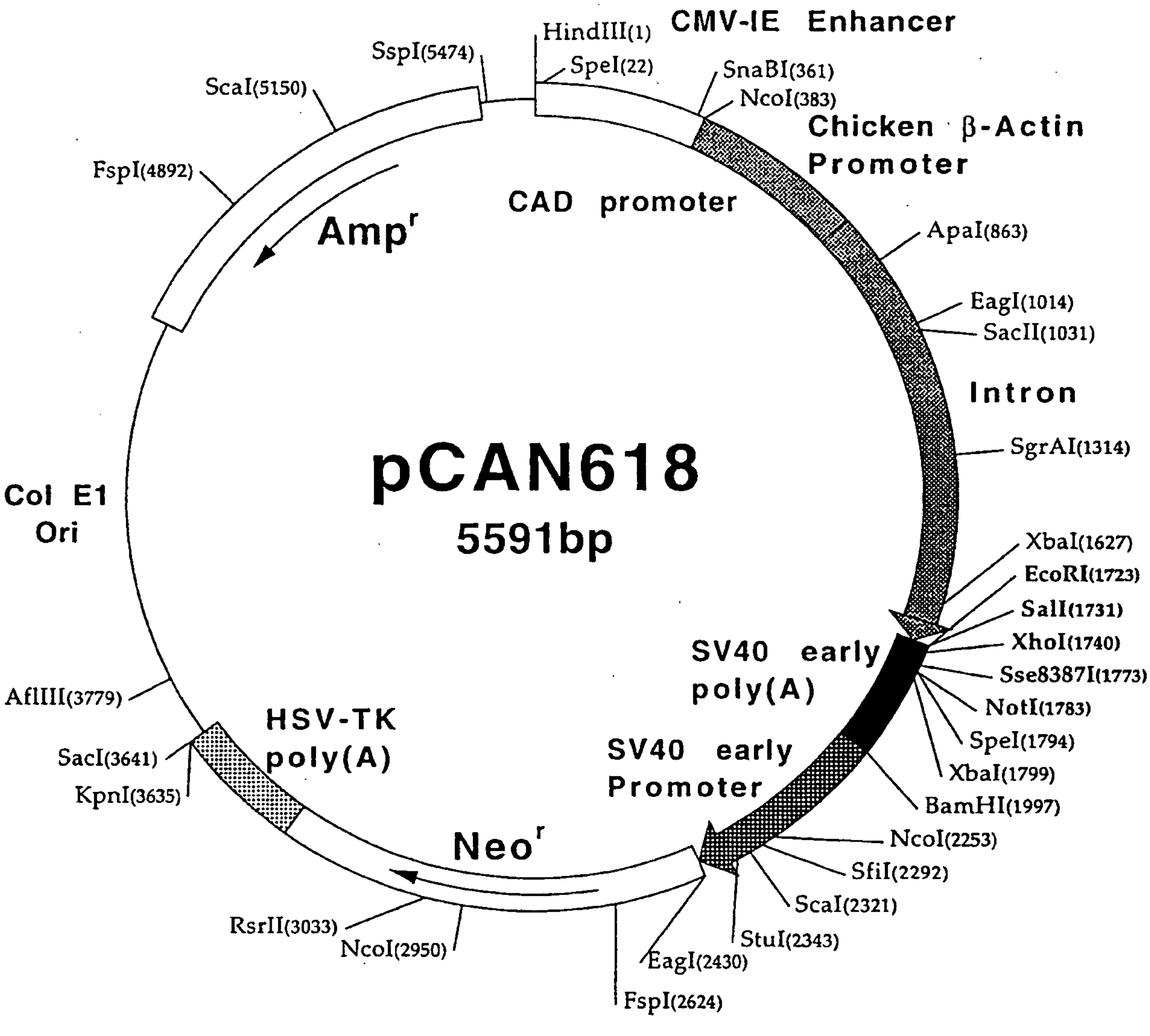

ZAQL
Fluorescence Change (% of Max)
125
100
75
50
25
0
-12
-11
-10
-9
-8
Peptide Concentration (logM)

図 11



pCAN618
5591bp
HindIII(1)
CMV-IE Enhancer
SpeI(22)
SnaBI(361)
NcoI(383)
Chicken β-Actin Promoter
CAD promoter
ApaI(863)
EagI(1014)
SacII(1031)
Intron
SgrAI(1314)
XbaI(1627)
EcoRI(1723)
SalI(1731)
XhoI(1740)
Sse8387I(1773)
NotI(1783)
SpeI(1794)
XbaI(1799)
SV40 early poly(A)
SV40 early Promoter
BamHI(1997)
NcoI(2253)
SfiI(2292)
ScaI(2321)
StuI(2343)
EagI(2430)
FspI(2624)
Neo^r
NcoI(2950)
RsrII(3033)
HSV-TK poly(A)
KpnI(3635)
SacI(3641)
AflIII(3779)
Col E1 Ori
FspI(4892)
Amp^r
ScaI(5150)
SspI(5474)

SEQUENCE LISTINGS

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.
<120> Novel G Protein Coupled Receptor Protein and Its Use
<130> 2634WOOP
<150> JP 11-241531
<151> 1999-08-27
<150> JP 2000-217474
<151> 2000-07-18
<160> 31
<160> 5
<210> 1
<211> 393
<212> PRT
<213> Human
<400> 1

```
Met Glu Thr Thr Met Gly Phe Met Asp Asp Asn Ala Thr Asn Thr Ser
                5                   10                  15
Thr Ser Phe Leu Ser Val Leu Asn Pro His Gly Ala His Ala Thr Ser
            20                  25                  30
Phe Pro Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu
        35                  40                  45
Asp Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
    50                  55                  60
Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
65                  70                  75                  80
Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
                85                  90                  95
```

```
Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
            100                 105                 110
Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
        115                 120                 125
Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg
    130                 135                 140
Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
145                 150                 155                 160
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
                165                 170                 175
Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu
            180                 185                 190
Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
        195                 200                 205
Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
    210                 215                 220
Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu
225                 230                 235                 240
Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser
                245                 250                 255
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
            260                 265                 270
Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys
        275                 280                 285
Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
    290                 295                 300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
305                 310                 315                 320
```

```
Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
                325                 330                 335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr
            340                 345                 350
Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly
        355                 360                 365
Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr
    370                 375                 380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
385                 390
<210> 2
<211> 1179
<212> DNA
<213> Human
<400> 2
ATGGAGACCA CCATGGGGTT CATGGATGAC AATGCCACCA ACACTTCCAC CAGCTTCCTT    60
TCTGTGCTCA ACCCTCATGG AGCCCATGCC ACTTCCTTCC CATTCAACTT CAGCTACAGC   120
GACTATGATA TGCCTTTGGA TGAAGATGAG GATGTGACCA ATTCCAGGAC GTTCTTTGCT   180
GCCAAGATTG TCATTGGGAT GGCCCTGGTG GGCATCATGC TGGTCTGCGG CATTGGAAAC   240
TTCATCTTTA TCGCTGCCCT GGTCCGCTAC AAGAAACTGC GCAACCTCAC CAACCTGCTC   300
ATCGCCAACC TGGCCATCTC TGACTTCCTG GTGGCCATTG TCTGCTGCCC CTTTGAGATG   360
GACTACTATG TGGTGCGCCA GCTCTCCTGG GAGCACGGCC ACGTCCTGTG CACCTCTGTC   420
AACTACCTGC GCACTGTCTC TCTCTATGTC TCCACCAATG CCCTGCTGGC CATCGCCATT   480
GACAGGTATC TGGCTATTGT CCATCCGCTG AGACCACGGA TGAAGTGCCA AACAGCCACT   540
GGCCTGATTG CCTTGGTGTG GACGGTGTCC ATCCTGATCG CCATCCCTTC CGCCTACTTC   600
ACCACCGAGA CGGTCCTCGT CATTGTCAAG AGCCAGGAAA AGATCTTCTG CGGCCAGATC   660
TGGCCTGTGG ACCAGCAGCT CTACTACAAG TCCTACTTCC TCTTTATCTT TGGCATAGAA   720
TTCGTGGGCC CCGTGGTCAC CATGACCCTG TGCTATGCCA GGATCTCCCG GGAGCTCTGG   780
```

```
TTCAAGGCGG TCCCTGGATT CCAGACAGAG CAGATCCGCA AGAGGCTGCG CTGCCGCAGG  840
AAGACGGTCC TGGTGCTCAT GTGCATCCTC ACCGCCTACG TGCTATGCTG GGCGCCCTTC  900
TACGGCTTCA CCATCGTGCG CGACTTCTTC CCCACCGTGT TCGTGAAGGA GAAGCACTAC  960
CTCACTGCCT TCTACATCGT CGAGTGCATC GCCATGAGCA ACAGCATGAT CAACACTCTG 1020
TGCTTCGTGA CCGTCAAGAA CGACACCGTC AAGTACTTCA AAAAGATCAT GTTGCTCCAC 1080
TGGAAGGCTT CTTACAATGG CGGTAAGTCC AGTGCAGACC TGGACCTCAA GACAATTGGG 1140
ATGCCTGCCA CCGAAGAGGT GGACTGCATC AGACTAAAA                        1179
```

<210> 3

<211> 1179

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

```
ATGGAGACCA CCATGGGGTT CATGGATGAC AATGCCACCA ACACTTCCAC CAGCTTCCTT   60
TCTGTGCTCA ACCCTCATGG AGCCCATGCC ACTTCCTTCC CATTCAACTT CAGCTACAGC  120
GACTATGATA TGCCTTTGGA TGAAGATGAG GATGTGACCA ATTCCAGGAC GTTCTTTGCT  180
GCCAAGATTG TCATTGGGAT GGCCCTGGTG GGCATCATGC TGGTCTGCGG CATTGGAAAC  240
TTCATCTTTA TCGCTGCCCT GGTCCGCTAC AAGAAACTGC GCAACCTCAC CAACCTGCTC  300
ATCGCCAACC TGGCCATCTC TGACTTCCTG GTGGCCATTG TCTGCTGCCC CTTTGAGATG  360
GACTACTATG TGGTGCGCCA GCTCTCCTGG GAGCACGGCC ACGTCCTGTG CACCTCTGTC  420
AACTACCTGC GCACTGTCTC TCTCTATGTC TCCACCAATG CCCTGCTGGC CATCGCCATT  480
GACAGGTATC TGGCTATTGT CCATCCGCTG AGACCACGGA TGAAGTGCCA AACAGCCACT  540
GGCCTGATTG CCTTGGTGTG GACGGTGTCC ATCCTGATCG CCATCCCTTC CGCCTACTTC  600
ACCACCGAGA CGGTCCTCGT CATTGTCAAG AGCCAGGAAA AGATCTTCTG CGGCCAGATC  660
TGGCCTGTGG ACCAGCAGCT CTACTACAAG TCCTACTTCC TCTTTATCTT TGGCATAGAA  720
TTCGTGGGCC CCGTGGTCAC CATGACCCTG TGCTATGCCA GGATCTCCCG GGAGCTCTGG  780
TTCAAGGCGG TCCCTGGATT CCAGACAGAG CAGATCCGCA AGAGGCTGCG CTGCCGCAGG  840
AAGACGGTCC TGGTGCTCAT GTGCATCCTC ACCGCCTACG TGCTATGCTG GGCGCCCTTC  900
TACGGCTTCA CCATCGTGCG CGACTTCTTC CCCACCGTGT TTGTGAAGGA GAAGCACTAC  960
```

CTCACTGCCT TCTACATCGT CGAGTGCATC GCCATGAGCA ACAGCATGAT CAACACTCTG 1020
TGCTTCGTGA CCGTCAAGAA CGACACCGTC AAGTACTTCA AAAAGATCAT GTTGCTCCAC 1080
TGGAAGGCTT CTTACAATGG CGGTAAGTCC AGTGCAGACC TGGACCTCAA GACAATTGGG 1140
ATGCCTGCCA CCGAAGAGGT GGACTGCATC AGACTAAAA 1179

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 4
GTCGACATGG AGACCACCAT GGGGTTCATG G 31

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 5
ACTAGTTTAT TTTAGTCTGA TGCAGTCCAC CTCTTC 36

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 6
TCATGTTGCT CCACTGGAAG G 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

CCAATTGTCT TGAGGTCCAG G 21

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 8

TTCTTACAAT GGCGGTAAGT CCAGTGCAG 29

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 9

GTCGACATGG AGACCACCAT GGGGTTCATG G 31

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 10

ACTAGTTTAT TTTAGTCTGA TGCAGTCCAC CTCTTC 36

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 11

Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly

5 10 15

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 12

GGTGCCACGC GAGTCTCAAT CATGCTCC 28

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

GGGGCCTGTG AGCGGGATGT CCAGTGTG 28

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 14

```
CTTCTTCAGG AAACGCAAGC ACCACACC                                  28
```

<210> 15

<211> 409

<212> DNA

<213> Human

<400> 15

```
CTTCTTCAGG AAACGCAAGC ACCACACCTG TCCTTGCTTG CCCAACCTGC TGTGCTCCAG  60
GTTCCCGGAC GGCAGGTACC GCTGCTCCAT GGACTTGAAG AACATCAATT TTTAGGCGCT 120
TGCCTGGTCT CAGGATACCC ACCATCCTTT TCCTGAGCAC AGCCTGGATT TTTATTTCTG 180
CCATGAAACC CAGCTCCCAT GACTCTCCCA GTCCCTACAC TGACTACCCT GATCTCTCTT 240
GTCTAGTACG CACATATGCA CACAGGCAGA CATACCTCCC ATCATGACAT GGTCCCCAGG 300
CTGGCCTGAG GATGTCACAG CTTGAGGCTG TGGTGTGAAA GGTGGCCAGC CTGGTTCTCT 360
TCCCTGCTCA GGCTGCCAGA GAGGTGGTAA ATGGCAGAAA GGACATTCC            409
```

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 16

```
CCACCATGAG AGGTGCCACG                                           20
```

<210> 17

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 17
CTCGAGCTCA GGAAAAGGAT GGTG 24
<210> 18
<211> 371
<212> DNA
<213> Human
<400> 18
CCACCATGAG AGGTGCCACG CGAGTCTCAA TCATGCTCCT CCTAGTAACT GTGTCTGACT 60
GTGCTGTGAT CACAGGGGCC TGTGAGCGGG ATGTCCAGTG TGGGGCAGGC ACCTGCTGTG 120
CCATCAGCCT GTGGCTTCGA GGGCTGCGGA TGTGCACCCC GCTGGGGCGG GAAGGCGAGG 180
AGTGCCACCC CGGCAGCCAC AAGATCCCCT TCTTCAGGAA ACGCAAGCAC CACACCTGTC 240
CTTGCTTGCC CAACCTGCTG TGCTCCAGGT TCCCGGACGG CAGGTACCGC TGCTCCATGG 300
ACTTGAAGAA CATCAATTTT TAGGCGCTTG CCTGGTCTCA GGATACCCAC CATCCTTTTC 360
CTGAGCTCGA G 371
<210> 19
<211> 371
<212> DNA
<213> Human
<400> 19
CCACCATGAG AGGTGCCACG CGAGTCTCAA TCATGCTCCT CCTAGTAACT GTGTCTGACT 60
GTGCTGTGAT CACAGGGGCC TGTGAGCGGG ATGTCCAGTG TGGGGCAGGC ACCTGCTGTG 120
CCATCAGCCT GTGGCTTCGA GGGCTGCGGA TGTGCACCCC GCTGGGGCGG GAAGGCGAGG 180
AGTGCCACCC CGGCAGCCAC AAGGTCCCCT TCTTCAGGAA ACGCAAGCAC CACACCTGTC 240

CTTGCTTGCC CAACCTGCTG TGCTCCAGGT TCCCGGACGG CAGGTACCGC TGCTCCATGG 300

ACTTGAAGAA CATCAATTTT TAGGCGCTTG CCTGGTCTCA GGATACCCAC CATCCTTTTC 360

CTGAGCTCGA G 371

<210> 20

<211> 86

<212> PRT

<213> Human

<400> 20

Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly

5 10 15

Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr

20 25 30

Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Ile

35 40 45

Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn

50 55 60

Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp

65 70 75 80

Leu Lys Asn Ile Asn Phe

85

<210> 21

<211> 86

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly

5 10 15

Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr

20 25 30

Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Val

35 40 45

Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn

50 55 60

Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp

65 70 75 80

Leu Lys Asn Ile Asn Phe

85

<210> 22

<211> 105

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val

5 10 15

Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys

20 25 30

Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg

35 40 45

Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser

50 55 60

His Lys Ile Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys

65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys

85 90 95

Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe

100 105

<210> 23

<211> 105

<212> PRT

<213> Human

<400> 23

```
Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
                5                   10                  15
Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
            20                  25                  30
Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
        35                  40                  45
Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
    50                  55                  60
His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
65                  70                  75                  80
Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
                85                  90                  95
Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
            100                 105
```

<210> 24

<211> 678

<212> DNA

<213> Human

<400> 24

```
AAGGCTGAGC GGGAGGAAGC GAGAGGCATC TAAGCAGGCA GTGTTTTGCC TTCACCCCAA   60
GTGACCATGA GAGGTGCCAC GCGAGTCTCA ATCATGCTCC TCCTAGTAAC TGTGTCTGAC  120
TGTGCTGTGA TCACAGGGGC CTGTGAGCGG GATGTCCAGT GTGGGGCAGG CACCTGCTGT  180
GCCATCAGCC TGTGGCTTCG AGGGCTGCGG ATGTGCACCC CGCTGGGGCG GGAAGGCGAG  240
```

GAGTGCCACC CCGGCAGCCA CAAGATCCCC TTCTTCAGGA AACGCAAGCA CCACACCTGT 300
CCTTGCTTGC CCAACCTGCT GTGCTCCAGG TTCCCGGACG GCAGGTACCG CTGCTCCATG 360
GACTTGAAGA ACATCAATTT TTAGGCGCTT GCCTGGTCTC AGGATACCCA CCATCCTTTT 420
CCTGAGCACA GCCTGGATTT TTATTTCTGC CATGAAACCC AGCTCCCATG ACTCTCCCAG 480
TCCCTACACT GACTACCCTG ATCTCTCTTG TCTAGTACGC ACATATGCAC ACAGGCAGAC 540
ATACCTCCCA TCATGACATG GTCCCCAGGC TGGCCTGAGG ATGTCACAGC TTGAGGCTGT 600
GGTGTGAAAG GTGGCCAGCC TGGTTCTCTT CCCTGCTCAG GCTGCCAGAG AGGTGGTAAA 660
TGGCAGAAAG GACATTCC 678

<210> 25
<211> 678
<212> DNA
<213> Human
<400> 25

AAGGCTGAGC GGGAGGAAGC GAGAGGCATC TAAGCAGGCA GTGTTTTGCC TTCACCCCAA 60
GTGACCATGA GAGGTGCCAC GCGAGTCTCA ATCATGCTCC TCCTAGTAAC TGTGTCTGAC 120
TGTGCTGTGA TCACAGGGGC CTGTGAGCGG GATGTCCAGT GTGGGGCAGG CACCTGCTGT 180
GCCATCAGCC TGTGGCTTCG AGGGCTGCGG ATGTGCACCC CGCTGGGGCG GGAAGGCGAG 240
GAGTGCCACC CCGGCAGCCA CAAGGTCCCC TTCTTCAGGA AACGCAAGCA CCACACCTGT 300
CCTTGCTTGC CCAACCTGCT GTGCTCCAGG TTCCCGGACG GCAGGTACCG CTGCTCCATG 360
GACTTGAAGA ACATCAATTT TTAGGCGCTT GCCTGGTCTC AGGATACCCA CCATCCTTTT 420
CCTGAGCACA GCCTGGATTT TTATTTCTGC CATGAAACCC AGCTCCCATG ACTCTCCCAG 480
TCCCTACACT GACTACCCTG ATCTCTCTTG TCTAGTACGC ACATATGCAC ACAGGCAGAC 540
ATACCTCCCA TCATGACATG GTCCCCAGGC TGGCCTGAGG ATGTCACAGC TTGAGGCTGT 600
GGTGTGAAAG GTGGCCAGCC TGGTTCTCTT CCCTGCTCAG GCTGCCAGAG AGGTGGTAAA 660
TGGCAGAAAG GACATTCC 678

<210> 26
<211> 258
<212> DNA

<213> Human

<400> 26

GCTGTGATCA CAGGGGCCTG TGAGCGGGAT GTCCAGTGTG GGGCAGGCAC CTGCTGTGCC 60
ATCAGCCTGT GGCTTCGAGG GCTGCGGATG TGCACCCCGC TGGGGCGGGA AGGCGAGGAG 120
TGCCACCCCG GCAGCCACAA GATCCCCTTC TTCAGGAAAC GCAAGCACCA CACCTGTCCT 180
TGCTTGCCCA ACCTGCTGTG CTCCAGGTTC CCGGACGGCA GGTACCGCTG CTCCATGGAC 240
TTGAAGAACA TCAATTTT 258

<210> 27

<211> 258

<212> DNA

<213> Human

<400> 27

GCTGTGATCA CAGGGGCCTG TGAGCGGGAT GTCCAGTGTG GGGCAGGCAC CTGCTGTGCC 60
ATCAGCCTGT GGCTTCGAGG GCTGCGGATG TGCACCCCGC TGGGGCGGGA AGGCGAGGAG 120
TGCCACCCCG GCAGCCACAA GGTCCCCTTC TTCAGGAAAC GCAAGCACCA CACCTGTCCT 180
TGCTTGCCCA ACCTGCTGTG CTCCAGGTTC CCGGACGGCA GGTACCGCTG CTCCATGGAC 240
TTGAAGAACA TCAATTTT 258

<210> 28

<211> 315

<212> DNA

<213> Human

<400> 28

ATGAGAGGTG CCACGCGAGT CTCAATCATG CTCCTCCTAG TAACTGTGTC TGACTGTGCT 60
GTGATCACAG GGGCCTGTGA GCGGGATGTC CAGTGTGGGG CAGGCACCTG CTGTGCCATC 120
AGCCTGTGGC TTCGAGGGCT GCGGATGTGC ACCCCGCTGG GGCGGGAAGG CGAGGAGTGC 180
CACCCCGGCA GCCACAAGAT CCCCTTCTTC AGGAAACGCA AGCACCACAC CTGTCCTTGC 240
TTGCCCAACC TGCTGTGCTC CAGGTTCCCG GACGGCAGGT ACCGCTGCTC CATGGACTTG 300
AAGAACATCA ATTTT 315

〈210〉 29

〈211〉 315

〈212〉 DNA

〈213〉 Human

〈400〉 29

ATGAGAGGTG CCACGCGAGT CTCAATCATG CTCCTCCTAG TAACTGTGTC TGACTGTGCT 60

GTGATCACAG GGGCCTGTGA GCGGGATGTC CAGTGTGGGG CAGGCACCTG CTGTGCCATC 120

AGCCTGTGGC TTCGAGGGCT GCGGATGTGC ACCCCGCTGG GGCGGGAAGG CGAGGAGTGC 180

CACCCCGGCA GCCACAAGGT CCCCTTCTTC AGGAAACGCA AGCACCACAC CTGTCCTTGC 240

TTGCCCAACC TGCTGTGCTC CAGGTTCCCG GACGGCAGGT ACCGCTGCTC CATGGACTTG 300

AAGAACATCA ATTTT 315

〈210〉 30

〈211〉 382

〈212〉 DNA

〈213〉 Human

〈400〉 30

GAATTCGCCC TTCCACCATG AGAGGTGCCA CGCGAGTCTC AATCATGCTC CTCCTAGTAA 60

CTGTGTCTGA CTGTGCTGTG ATCACAGGGG CCTGTGAGCG GGATGTCCAG TGTGGGGCAG 120

GCACCTGCTG TGCCATCAGC CTGTGGCTTC GAGGGCTGCG GATGTGCACC CCGCTGGGGC 180

GGGAAGGCGA GGAGTGCCAC CCCGGCAGCC ACAAGGTCCC CTTCTTCAGG AAACGCAAGC 240

ACCACACCTG TCCTTGCTTG CCCAACCTGC TGTGCTCCAG GTTCCCGGAC GGCAGGTACC 300

GCTGCTCCAT GGACTTGAAG AACATCAATT TTTAGGCGCT TGCCTGGTCT CAGGATACCC 360

ACCATCCTTT CCTGAGCTCG AG 382

〈210〉 31

<211> 10

〈212〉 PRT

〈213〉 Human

〈400〉 31

Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp

5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/05685

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl^7 C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68, A61K45/00, A61P43/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl^7 C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE(STN),Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,BIOSIS(DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS,INC.), 22 October, 1998 (22.10.98) & AU, 9869736, A & US, 5891720, A & EP, 1007536, A1	1-14
A	WO, 95/21245, A1 (SYNAPTIC PHARMACEUTICAL CORPORATION), 10 August, 1995 (10.08.95) & AU, 9517432, A & US, 5545549, A & EP, 802972, A1 & ES, 2107398, T1 & US, 5977307, A	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 11 December, 2000 (11.12.00)	Date of mailing of the international search report 19 December, 2000 (19.12.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告　　国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ００／０５６８５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int. Cl^7　C12N15/09、C07K14/705、C07K16/28、C12N1/21、C12N5/10、C12P21/02、C12P21/08、C12Q1/68、A61K45/00、A61P43/00

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int. Cl^7　C12N15/09、C07K14/705、C07K16/28、C12N1/21、C12N5/10、C12P21/02、C12P21/08、C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
MEDLINE(STN)、Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、BIOSIS(DIALOG)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 22. 10月. 1998 (22. 10. 98) &AU, 9869736, A　&US, 5891720, A　&EP, 1007536, A1	1－14
A	WO, 95/21245, A1 (SYNAPTIC PHARMACEUTICAL CORPORATION) 10. 8月. 1995 (10. 08. 95) &AU, 9517432, A &US, 5545549, A &EP, 802972, A1 &ES, 2107398, T1 &US, 5977307, A	1－14

□ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １１．１２．００	国際調査報告の発送日 19.12.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　９６４１ 甲斐　順子　　印 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☑ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: ______________________

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.